

博士論文

リボソーム衝突に起因する品質管理の誘導機構の解明

友松 翔太

目次

要旨	3
序章	7
リボソーム衝突の要因	8
リボソーム衝突に起因したイベント	10
第 1 章 リボソーム衝突における Mbf1 の機能解析	15
1-1. 序論.....	16
1-2. 目的.....	17
1-3. 結果.....	18
1-4. 考察.....	24
第 2 章 uS10 のユビキチン修飾の高次構造とその機能の解明.....	27
2-1. 序論.....	28
2-2. 目的.....	30
2-3. 結果.....	31
2-4. 考察.....	39

第 3 章 材料と実験方法	44
3-1. 材料.....	45
3-2. 実験方法	57
図と表.....	66
参考文献.....	96
謝辞	107

要旨

リボソームは速度を持って翻訳反応を行うが、mRNA 配列や環境ストレス等の要因によって停滞する。停滞したリボソームに対し、同一 mRNA を翻訳する後続のリボソームが衝突する場合がある。細胞はリボソーム衝突を異常として認識し、停滞したリボソームを強制的にサブユニット解離することで異常を解除する。サブユニット解離により産生される不完全な新生ペプチド鎖は、Ribosome-associated Quality Control (RQC) という品質管理により速やかに分解され、細胞内のタンパク恒常性が維持されている。また、リボソーム衝突を引き起こした mRNA は No-Go Decay (NGD) という品質管理により除去され、リボソーム衝突の再発が防止されている。NGD は RQC と共役した $\text{NGD}^{\text{RQC}+}$ と、共役しない $\text{NGD}^{\text{RQC}-}$ に区別される。リボソーム衝突が生じた際には、これら分解系のイベントが誘導されるだけでなく、コドンの読み枠を変更して翻訳を行う Ribosomal Frameshift (RFS) という現象も誘導される。本研究は、リボソーム衝突に起因する品質管理の誘導がどのように制御されているのかを明らかにすることを目的とした。

リボソーム衝突における Mbf1 の機能解析 (第 1 章)

【背景・目的】

近年、リボソーム衝突を認識する因子として Mbf1 が同定された。Mbf1 は、レアコドン連続配列に起因するリボソーム衝突において、RFS を抑制することが報告されていたが、RQC や NGD における機能は未解明であった。そこで本研究では、レポーター解析により、RQC、NGD、および RFS における Mbf1 の機能の解明を目指した。

【結果・考察】

本解析では、レアコドン連続配列に加え、poly(A)配列や、内在性の停滞配列 *SDD1* を組み込んだレポーターを利用し、各停滞配列における Mbf1 の機能を調査した。レポーター解析の結果、レアコドン連続配列では、Mbf1 は RFS を抑制し、RQC と NGD を誘導していた。

poly(A)配列における RQC・NGD・RFS に対して Mbfl の寄与はなかった。*SDDI* 配列では、Mbfl は NGD^{RQC+}を誘導する一方で、RQC と NGD^{RQC-}、RFS には寄与していなかった。

これら Mbfl の機能が、衝突リボソームへの結合に依存するかについて検討を行った。リボソームあるいは mRNA と相互作用するアミノ酸残基に変異を導入し、リボソームとの相互作用が弱い変異型 Mbfl を作成した。相補実験を行ったところ、リボソームとの結合能が低い変異体を相補した株は、*mbfl*Δ株と同様の表現型を示した。このことから、Mbfl のリボソーム結合能が、リボソーム衝突に起因する品質管理の誘導の制御に必要であることが示唆された。

以上の研究から、Mbfl は停滞配列に応じて特定の品質管理を制御することが明らかになった。また、この機能はリボソームへの結合能に依存していることを見出した。本研究で解析した 3 つの配列で翻訳停滞する要因は異なっており、衝突リボソームの構造も異なっている。こうした違いが、Mbfl の機能に影響を与えていると推定される。

uS10 のユビキチン修飾の高次構造とその機能の解明 (第 2 章)

【背景・目的】

E3 ユビキチンライゲース Hel2 は、衝突したリボソームを認識し、停滞したリボソームの uS10 に K63 型ポリユビキチン鎖 (K63 鎖) を形成する。RQT (RQC Trigger) 複合体は、このユビキチン修飾を認識し、停滞したリボソームを 40S サブユニットと 60S サブユニットへと解離させ、RQC を引き起こす。このように、uS10 のユビキチン化反応やデコーダー分子の機能が明らかになっている一方で、脱ユビキチン化酵素 (DUB: deubiquitinase) は未同定なままであった。そこで本研究では、uS10 のユビキチン修飾を除去する DUB の探索を行い、その機能を明らかにすることを目的とした。また先行研究より、uS10 には K63 鎖だけでなく K48 鎖も存在することが報告されていた。しかし、これらのユビキチン鎖がどのように連結しているかは不明なままであった。そこで uS10 のユビキチン修飾の高次構造を明らかにするとともに、その機能の解明を試みた。

【結果・考察】

遺伝学的スクリーニングを実施し、uS10 の DUB として Ubp2 と Ubp3 を同定することに成功した。これら脱ユビキチン化酵素の基質特異性を明らかにするために、試験管内反応を実施した。その結果、Ubp2 は 40S サブユニットの K63 鎖を切断し、Ubp3 は翻訳伸長途中のリボソームのユビキチン鎖を切断することを明らかにした。また、質量分析法を用いた解析を行い、Ubp2 は K48 鎖と K63 鎖を、Ubp3 は K48 鎖を制御することを明らかにした。レポーター解析により、Ubp2 と Ubp3 は RQC の促進因子であることが明らかになった。これら結果より、Ubp2 と Ubp3 は RQC の誘導を阻害すると想定されている K48 鎖の制御を介して、RQC を促進していることが示唆された。

つづいて、uS10 のユビキチン鎖の高次構造について解析を進めた。質量分析法および試験管内反応を用いて検討した結果、uS10 には、分岐がなく、根本に K48 鎖が、遠位に K63 鎖が形成された混合鎖が存在していることが明らかとなった。根本の連結型を特異的に解析するため、ユビキチンを uS10 の N 末端に連結させたキメラ分子 Ub-uS10 を構築した。根本に K63 鎖が形成できない UbK63R-uS10 を相補した株では RQC の誘導効率が減弱したことから、uS10 のユビキチン鎖の根本が K63 鎖であることが RQC の誘導に必須であることが示唆された。以上より、ユビキチン鎖の高次構造を介した RQC の制御機構の存在が明らかになった。

序章

翻訳停滞したリボソームに対して、同一 mRNA 上を走る後続のリボソームが衝突すると、Ribosome-associated Quality Control (RQC)、No-Go Decay (NGD)、Ribosomal Frameshift (RFS) の 3 つのイベントが誘導される。RQC では停滞リボソームのサブユニット解離により産生される新生ペプチド鎖を、NGD ではリボソーム衝突を引き起こした mRNA を分解する。また、RFS はコドンの読み枠を変更して翻訳を行う異常な現象である。本章では、先行研究より明らかになったリボソーム衝突を引き起こす要因と、これら 3 つのイベントの分子メカニズムについて記述する。

リボソーム衝突の要因

翻訳反応は、新生ペプチド鎖の折りたたみ¹⁻³、ターゲティング⁴⁻⁶、タンパク質複合体の組み立てなど⁷⁻⁹、さまざまなタンパク質の成熟過程と密接に関連しており、これら過程に応じて翻訳速度が調節されている。そのため、細胞内では不均一な速度で翻訳が行われているが、強い翻訳停滞は異常として識別され、強制的なリボソームのサブユニット解離を介して解消される¹⁰。また翻訳停滞を引き起こした mRNA を速やかに分解することで、異常翻訳の再発を防止している¹¹。細胞は、タンパク質の成熟過程と共役した一時的な翻訳停滞を異常と認識しないために、停滞したリボソームに対して、同一 mRNA を翻訳する後続のリボソームが衝突した状態を異常な翻訳停滞の指標とする¹²。クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた構造学的解析から、衝突リボソームの衝突界面に特徴的な構造を形成していることが明らかとなった¹³⁻¹⁶。また、生化学的解析から衝突リボソームには隙間がなく、RNase が衝突リボソーム間の mRNA を切断できないことが報告されている¹⁷。これらの知見から、衝突リボソームは、単に 2 つのリボソームが並置しているのではなく、密に相互作用した特殊な構造体であると言える。

リボソーム衝突に関する研究の多くは、mRNA の配列に起因するものを対象にして行われてきた。また、さまざまなストレスで RNA が損傷を受けると正しく翻訳反応が行うことが

できず、翻訳停滞が引き起こされると考えられている^{18,19}。本研究では、リボソーム衝突を引き起こす mRNA 配列を組み込んだレポーターを使用して解析を行った。本節では、本研究で使用した配列をはじめ、解析がよく行われている配列について記述する。

poly(A)配列

リボソーム衝突を引き起こす mRNA 配列として poly(A)配列がよく知られている^{16,20-25}。この配列は未熟なポリアデニル化によって生成され、細胞内 mRNA の 1~5% の mRNA に存在すると推定されている²⁶。翻訳停滞が生じる原因として、poly(A)から翻訳されたポリリジンが、リボソームトンネル内腔と静電相互作用することが報告されている²⁷。近年の構造解析により、ポリリジンがペプチジルトランスフェラーゼと相互作用し、また A サイトのアデニン残基が rRNA と相互作用している様子が観察された²⁵。このことから poly(A)配列はペプチド転移反応とコドン解読を阻害している可能性がある。poly(A)配列は出芽酵母だけでなく、哺乳類細胞でも翻訳停滞を引き起こす^{16,24,28}。

レアコドン連続配列

強力に翻訳停滞を引き起こす配列として、レアコドン連続配列がある^{23,29}。レアコドンは出現頻度が低いコドンであり、対応する tRNA が少ない。また、レアコドン CGA に完全に対応する tRNA は出芽酵母に存在せず、tRNA^{Arg}(ACG)から産生される tRNA^{Arg}(ICG)が用いられ、コドンのアデニンと、アンチコドンのイノシンが揺らぎ塩基対を形成する³⁰⁻³²。tRNA の存在が少なく、安定な塩基対形成ができないという 2 つの理由から、CGA コドンが連続すると極度に翻訳速度が低下し、リボソーム衝突が誘発される。

トリプトファン連続配列

出芽酵母ではトリプトファンが連続した場合でもリボソーム衝突を引き起こす^{23,33}。トリプトファンは側鎖が嵩高いため、リボソームトンネル内で新生ペプチド鎖が詰まり、翻訳停滞

が引き起こされると考えられている。

ステムループ構造

ステムループは相補的なヌクレオチド配列が、塩基対形成によって二重らせんを形成した構造である。この構造は強固であるため、ほどくのに時間がかかり、リボソーム衝突を引き起こすと考えられている。

SDD1 配列

近年、リボソーム衝突を引き起こす内在性の配列として *SDD1* が同定された¹⁴。構造解析から、*SDD1* 配列は、側鎖の大きい新生ペプチド鎖がリボソームトンネルの狭窄部位で詰まり、また P サイトと A サイトにレアコドン連続配列が位置していることが明らかとなった¹⁴。これら複合的な要因で *SDD1* 配列はリボソーム衝突を引き起こすと考えられている。一方で、*SDD1* 配列がリボソーム衝突を引き起こす生理学的意義については不明であり、今後の課題である。

リボソーム衝突に起因したイベント

リボソーム衝突が生じると RQC、NGD、RFS の 3 つのイベントが誘導される。RQC の惹起に必要な停滞リボソームのサブユニット解離や、NGD における mRNA の切断は、リボソーム衝突の解消につながる。RFS が生じることで翻訳しやすい読み枠に変更され、翻訳停滞が解消される場合もある。本節では、これらイベントの分子メカニズムについて記述する。

RQC

RQC では、1) 衝突リボソームを認識し、2) 停滞したリボソームのユビキチン修飾で印をつけたのち、3) 停滞したリボソームのサブユニット解離を行い、4) 解離した 60S サブユニット上の新生ペプチド鎖を分解する (図 4)。RQC の分子メカニズムについて、各段階に

分けて以下に記す。

衝突リボソームの認識

近年の構造解析より、衝突したリボソームは密接に相互作用していることが明らかになった^{14,15}。停滞したリボソームの Asc1 と、衝突したリボソームの Asc1 が相互作用しており、この相互作用領域がリボソーム衝突を認識する場になっていると考えられている。衝突リボソームを認識する因子として、ユビキチン化酵素 Hel2 (ZNF598: Hel2 の哺乳類細胞のホモログ) が知られている^{14,29,34-36}。また構造解析より、*SDD1* 配列で形成されたトライソームに Mbf1 が結合していることが明らかとなった³⁶。Mbf1 は衝突したリボソームの mRNA entry channel 近傍に存在し、40S サブユニット構成因子 uS3 や mRNA と相互作用している³⁶。Hel2 や Mbf1 の衝突リボソームへの結合が、もう一方の因子に依存しているかは明らかとなっていない。ただし、哺乳類細胞では、EDF1 (Mbf1 のホモログ) の衝突リボソームへの結合は ZNF598 に依存しないが、RACK1 (Asc1 のホモログ) の存在に依存している³⁶。

停滞したリボソームのユビキチン化

衝突したリボソームを認識した Hel2 は、40S サブユニット構成因子 uS10 をユビキチン修飾する^{14,15,29,37}。このユビキチン修飾は E2 酵素 Ubc4 とともに行われる^{14,15,29,37}。*in vitro* 反応を用いた解析より、Hel2 と Ubc4 は、uS10 に K63 型ユビキチン鎖 (K63 鎖) を主に形成することが示唆されている^{15,37}。哺乳類細胞においては、ZNF598 が uS10 と eS10 をユビキチン修飾する^{16,28,38}。ZNF598 とともにユビキチン化を行う E2 は UBE2D3 であると想定されている^{16,39,40}。また *in vitro* 反応の結果から ZNF598 と UBE2D2 は、uS10 と eS10 の両方に K63 鎖を形成することが明らかになっている¹⁶。

停滞したリボソームのサブユニット解離

ユビキチン化されたリボソームは RQT (RQC Trigger) 複合体によって認識され、40S サブ

ユニットと 60S サブユニットへと解離される^{14,29,37,41}。RQT 複合体はヘリケース活性を有する Slh1 と、ユビキチン結合能を有する Cue3 および Rqt4 からなる三者複合体である^{29,37}。構造解析から、RQT 複合体がリボソームの E サイト近傍に位置することが報告されている⁴²。サブユニット解離には Slh1 のヘリケース活性が必要である^{14,29}。*in vitro* 反応を用いた解析から、解離反応には、停滞したリボソームの外側に mRNA が位置する必要があると報告されている⁴²。そのため、Slh1 が停滞したリボソームの外側にある mRNA を引っ張ることでサブユニット解離を実行するというモデルが提唱されている。また、Cue3 と Rqt4 は K63 型ユビキチン修飾と相互作用でき、このユビキチン結合能がサブユニット解離に必要である^{29,37}。以上の知見から、2つのユビキチン結合タンパク質を介して、衝突リボソームに RQT 複合体がリクルートされたのち、Slh1 によって停滞したリボソームのサブユニット解離が実行されると考えられている。

解離した 60S サブユニット上の新生ペプチド鎖の分解

解離した 60S サブユニット上の新生ペプチド鎖は、ユビキチン-プロテアソーム・システムによって速やかに分解される^{23,43-46}。解離した 60S サブユニットには、Rqc1、Rqc2、Ltn1 がリクルートされ RQC 複合体を形成する^{43,47}。Ltn1 は露出している新生ペプチド鎖に対して、ユビキチンを付加する^{44,46}。Rqc2 は tRNA^{Ala} と tRNA^{thr} を RQC 複合体に呼び込み、翻訳因子 eIF5A とともに新生ペプチド鎖の C 末端にアラニンとスレオニンをランダムに付加する^{29,48,49}。このアラニンとスレオニンからなるタグは CAT-tail とよばれる。CAT-tail の付加により、リボソームトンネル内のリジン残基を押し出し、Ltn1 によるユビキチン化を可能にしている。

新生ペプチド鎖のリリースは、ペプチジル tRNA の切断をもって行われる。Vms1 と補因子の Arb1 が、tRNA の 3'末端 CCA モチーフをペプチド鎖の残す形で tRNA を切断する⁵⁰。切断された新生ペプチド鎖は、Cdc48 によって 60S サブユニットから引き抜かれ、プロテアソームに運ばれ、分解を受ける^{43,47,51}。

NGD

NGD は、リボソーム衝突を引き起こした mRNA を分子内切断し、mRNA 断片を迅速に分解する機構である^{15,50,51} (図式)。NGD には、RQC と共役する NGD^{RQC+} と共役しない NGD^{RQC-} が存在する¹⁵。どちらの NGD においても、Hel2 のユビキチン化活性が必須であり、エンドヌクレアーゼ Cue2 が mRNA の内部切断を行う^{15,52,53}。mRNA 断片は、3'→5' 方向に RNA を分解する Ski 複合体 (エキソソーム) と、5'→3' 方向に RNA を分解する Xrn1 (エキソヌクレアーゼ) によって分解される⁵⁴。

NGD^{RQC+} では、Hel2 による uS10 のユビキチン化と、つづく RQT 複合体によるサブユニット解離のあとで、mRNA 切断が行われる。プライマーエクステンション法を用いた解析から、切断点は解離したリボソームが覆っていた領域で行われていることが示唆されている¹⁵。Cue2 W122A 変異体は NGD^{RQC+} の mRNA 切断が行えないことが報告されている⁵²。

一方、NGD^{RQC-} は、衝突リボソームの 5' 末端側の位置で mRNA の切断が行われる¹⁵。そのため、切断点は NGD^{RQC+} の場合よりも 5' 側にシフトする。NGD^{RQC-} は eS7 をユビキチン化することができる Hel2 1-315 変異体によって誘導される¹⁵。ただし、Hel2 1-315 変異体は eS7 をモノユビキチン化できないため、E3 酵素 Not4 が eS7 のものユビキチン化を行う¹⁵。また、NGD^{RQC-} の mRNA 切断には、Cue2 のユビキチン結合活性が必要である⁵²。これらの知見から、Not4 と Hel2 が段階的に eS7 をユビキチン修飾し、これを Cue2 が認識することで NGD^{RQC-} の mRNA 切断が実行されると考えられている。

RFS

Ribosomal frameshifting は、同一 mRNA から異なる読み枠で翻訳を行い、異なるアミノ酸配列のタンパク質を合成する機構である。出芽酵母では、レアコドン連続配列で RFS が誘発されることが知られており、この RFS は +1 RFS である^{31,32,55,56}。この RFS には、リボソーム衝突が必要であることが強く示唆されているが、分子メカニズムは依然として不明のままである。以下に、これまでの報告内容を記す。

Hani S. Zaher のグループは、RFS の誘導機構モデルとして、衝突リボソームが mRNA を引っ張ることを提唱している⁵⁷。しかし、このモデルについて十分に検証されておらず、検討の余地がある。Elizabeth J Grayhack のグループは、遺伝学的スクリーニングにより、RFS を促進する因子として eEF3 を同定した⁵⁶。しかし、RFS 誘導における eEF3 の機能は未解明なままである。

RFS の抑制因子として、遺伝学的解析から Asc1、uS3、Mbf1 が同定された⁵⁵。Asc1 は RQC や NGD を抑制することで RFS を抑制していると考えられている。一方、uS3 と Mbf1 は、1) mRNA の動きを止める、または、2) eEF3 の衝突リボソームへの結合を防ぐことで、RFS を抑制すると考えられている^{55,56}。これら 2 つの抑制機構モデルについて、検証は不十分であり、今後、さらなる解析が必要である。

第 1 章

リボソーム衝突における Mbf1 の機能解析

1-1. 序論

リボソーム衝突に起因する生体内反応について、人為的に作成した mRNA 配列を用いてリボソーム衝突を誘発し、解析が行われてきた。代表的な停滞誘導 mRNA 配列として、レアコドン連続配列とアデニンを連続させた poly(A)配列が挙げられる。レアコドンは対応する tRNA が少ないため、A サイトへの tRNA の供給に時間がかかる。また出芽酵母のレアコドン CGA は、3 番目の塩基対形成で揺らぎがあるため、コドン-アンチコドンの構造が不安定である³⁰⁻³²。これらの理由から、レアコドンが連続すると翻訳伸長反応が著しく遅延する。poly(A)配列は、新生ペプチド鎖のポリリジンがペプチジルトランスフェラーゼセンターと、poly(A)配列が 18S rRNA とそれぞれ相互作用することで翻訳反応が停滞すると考えられている²⁵。近年、出芽酵母における内在性の停滞配列として *SDD1* が同定された¹⁴。*SDD1* 配列は主に、レアコドン連続配列と、新生ペプチド鎖がリボソームトンネルの狭窄部位でスタックすることで翻訳停滞を引き起こすと考えられている。

2020 年、Rachel Green および Roland Beckmann らのグループは、*SDD1* mRNA で形成される衝突リボソームに、Mbf1 が結合していることを報告した³⁶。この構造において、Mbf1 は、衝突したリボソームの mRNA entry channel 近傍に結合しており、リボソームタンパク質 uS3 や mRNA と相互作用していることが確認された。

Mbf1 は、すでにレアコドン連続配列において、リボソームフレームシフト (Ribosomal frameshift 以下 RFS) を抑制する因子として報告されている⁵⁵。レアコドン連続配列は RQC や NGD といった品質管理機構を誘導することから、Mbf1 は品質管理に影響を及ぼす可能性がある。

RFS と NGD に関する研究が先行して行われている。Hani S. Zaher らのグループは、*uS3 R116A R117A* 変異株では、ステムループ、レアコドン連続配列および poly(A)配列におけ

る NGD を誘導されないことを報告した⁵⁷。またこの変異体で、レアコドン連続配列に起因する RFS が促進されることから⁵⁷、彼らは、NGD が欠失した際に RFS が誘発されると主張した。しかし、NGD と RFS の因果関係は、まだ議論の途中にあり、RFS が促進されることで NGD が抑制されている可能性も十分にある。またレアコドン連続配列でしか解析を行っておらず、ほかの停滞配列における RFS と NGD・RQC の関係性についても明らかにする必要がある。

1-2. 目的

本研究では、リボソーム衝突に結合する Mbf1 の RQC、NGD および RFS における機能について明らかにすることを目的とした。また、リボソーム衝突を誘発する mRNA 配列として、レアコドン連続配列、poly(A)配列、*SDD1* 配列の 3 種類を用いることで、Mbf1 の機能の一般性についても検討を行う（図 1-1-A）。

1-3. 結果

本研究の戦略

レアコドン連続配列、poly(A)配列、*SDD1* 配列における RQC、NGD、RFS の誘導を確認するため、レポーター遺伝子を用いた (図 1-1-A.)。レアコドン連続配列および poly(A)配列においては、GFP と FLAG-HIS3 の間にそれぞれの配列を挿入したレポーターを利用した。*SDD1* 配列における解析は、全長の *SDD1* 配列の N 末端に HA タグを、C 末端に V5 タグと FLAG タグを連続して付加したレポーターを利用した。レアコドン連続配列における RFS は +1 RFS であることが報告されている。そこで *GFP-X-FLAG-HIS3* 遺伝子 (X は停滞配列) の X の直後にグアニンを 1 塩基挿入し、+1 RFS が生じた場合のみ、HIS3 の C 末端まで翻訳した産物ができるレポーターを構築した。

また RQC と NGD の誘導効率を求めるために、遺伝子欠損変異株を用いて解析を行った (図 1-1-A.)。RQC については *ltn1Δ* 株を利用し、Ltn1 依存に分解されるアレスト産物の蓄積量をウェスタン・ブロットにより確認した。NGD^{RQC+} と NGD^{RQC-}については、それぞれ *ski2Δ* 株と *ski2Δ slh1Δ* 株を使用し、Cue2 の mRNA 切断により産生される 5'側の切断産物 (5' NGD IM: 5' NGD Intermediate) をノーザン・ブロットにより確認した。RFS については、*GFP-X+G-FLAG-HIS3* 遺伝子から、+1 RFS が生じることで産生されるタンパク質の発現量をウェスタン・ブロットにより確認した。

Mbf1 は、レアコドン連続配列における RQC と NGD^{RQC+} と NGD^{RQC-}の誘導に必要であり、また RFS の誘導を抑制する

まず初めにレアコドン配列における Mbf1 の機能解析を行った。野生株および、RQC を誘導しない *hel2Δ* 株と、Mbf1 とは異なる機序で +1 RFS を誘発する *asc1Δ* 株をコントロールに置いた。その結果、*mbf1Δ ltn1Δ* 株ではアレスト産物の蓄積が観察されない一方で、+1 RFS 産物と推察される産物が検出された (図 1-2-A)。このことから、Mbf1 は RQC を促進し、+1 RFS を抑制していることが示唆された。NGD については、NGD が誘導されない

2 種類の変異株 (NGD を誘導する Hel2 を欠損させた株と、mRNA の内部切断を行う Cue2 を欠損させた株)、NGD^{RQC-}のみ誘導される変異株 (リボソームのサブユニット解離を引き起こす Slh1 を欠損させた株) をコントロールに置き、解析を行った。その結果、*mbf1Δ ski2Δ* 株および、*mbf1Δ slh1Δ ski2Δ* 株で 5' NGD IM が検出されなかった (図 1-2-B)。このことから、Mbf1 は NGD^{RQC+} と NGD^{RQC-} の誘導に必要であることが示唆された。さらに RFS について、*mbf1Δ* 株では野生株と比較して +1 RFS 産物が増加していた (図 1-2-C)。図 1-2-A の結果も踏まえ、先行研究同様に Mbf1 が +1 RFS を抑制することを確認できた。RQC と NGD の誘導に必須な Hel2 を欠損した株で +1 RFS 産物が観察されたことから、Hel2 も +1 RFS を抑制している可能性が示唆された。また NGD の誘導に必須な Cue2 を欠損した株で +1 RFS 産物が観察されなかった。Zaher らが提唱したモデルと異なり、NGD の欠損の結果として +1 RFS が誘導されるわけではないことが明らかになった。

Mbf1 は、poly(A)配列における RQC、NGD^{RQC+}、NGD^{RQC-}、RFS の誘導に関与しない

次に poly(A)配列における Mbf1 の機能解析を行った。レアコドン連続配列の解析と同様のコントロールを置き、RQC、NGD、+1 RFS の誘導を観察した。*mbf1Δ ltn1Δ* 株でアレスト産物が検出され (図 1-2-D)、*mbf1Δ ski2Δ* 株及び *mbf1Δ slh1Δ ski2Δ* 株で 5' NGD IM が検出された (図 1-2-E)。一方で、*mbf1Δ* 株で +1 RFS 産物は検出されなかった (図 1-2-F)。このことから、poly(A)配列におけるリボソーム衝突において、Mbf1 は、RQC、NGD^{RQC+}、NGD^{RQC-}、+1 RFS の誘導に必要でないことが明らかとなった。

Mbf1 は、SDD1 配列における RQC と NGD^{RQC-}、RFS の誘導に関与しないが、NGD^{RQC+} の誘導に必要である

次に *SDD1* 配列における Mbf1 の機能解析を行った。これまでの解析と同様のコントロールを置き、RQC、NGD、+1 RFS の誘導を観察した。+1 RFS の誘導の解析には *GFP-X+g-FLAG-HIS3* 遺伝子の X に *SDD1* の最小停滞配列を挿入したレポーターを用いた。解析の

結果、*mbf1Δ ltn1Δ*株でアレスト産物が検出された（図 1-2-G）、*mbf1Δ ski2Δ*株で 5' NGD IM が検出されなかった一方で、*mbf1Δ slh1Δ ski2Δ*株で 5' NGD IM が検出された（図 1-2-H）。また *mbf1Δ*株で+1 RFS 産物が検出された（図 1-2-I）。

SDD1 の全長配列における+1 RFS の誘導効率についても解析を行なった。*SDD1* における停滞では、停滞したリボソームの A-site が 213 番目のアルギニン残基に位置していることが明らかになっている。この位置で+1RFS が生じると、停滞配列のすぐ直後で終止コドンが生じ、アレスト産物とほぼ同じ分子量の+1 RFS 産物が産生されてしまう。そこで、214 番目のロイシン残基のコドン UUG を CUU に置換し、+1 RFS 産物がアレスト産物よりも、およそ 1 kDa 大きくなる *SDD1 L(UUG)214L(CUU)* 変異体を作成した。この変異体により、アレスト産物と全長産物の間に+1 RFS 産物が検出されると予想される（図 1-2-J）。+1 RFS を誘発することが知られている Asc1 を欠損させた株では+1 RFS と思われる産物が検出されたが、*mbf1Δ*株では検出されなかった（図 1-2-K）。これらの結果から、*SDD1* 配列におけるリボソーム衝突において、Mbf1 は、RQC、NGD^{RQC-}、+1 RFS に不要である一方で、NGD^{RQC+}には必要であることが明らかとなった。

以上の結果より、Mbf1 は停滞配列に応じて、RQC、NGD、RFS の誘導を別々に制御しており、レアコドン連続配列における RQC と NGD の誘導と、*SDD1* 配列における NGD^{RQC+} の誘導に必要であることが明らかになった。

Mbf1 のリボソーム結合能が、リボソーム衝突に起因するイベントの誘導制御に必要である *mbf1Δ*株を用いた解析で見られた表現型が、Mbf1 とリボソームとの結合に起因するかを検証した。先行研究で、Mbf1 とリボソームが相互作用する様子が観察されている。そこで、Mbf1 がリボソームと相互作用するアミノ酸残基に変異を入れ、リボソームとの相互作用が弱い変異体の作成を試みた。

Peter Tesina 博士、Roland Beckmann 博士らの構造解析より、Mbf1 の D66 は uS3 の K108 と静電相互作用する様子が観察され、T69、D70、I71、V72 は uS3 の近傍に位置していた

(図 1-3-A)。これらのアミノ酸残基がリボソームとの相互作用に必要であることを検証するため、側鎖の電荷を負電荷から正電荷に変更した Mbf1 D66R 変異体と各アミノ酸をアラニンに置換した Mbf1 T69A/D70A/I71A/V72A 変異体、それぞれの変異を組み合わせた Mbf1 D66R/T69A/D70A/I71A/V72A 変異体を作成した。これら変異体とリボソームとの相互作用を確認するため、ポリソーム解析を実施した (図 1-3-B)。Mbf1 野生型 (wild type, 以下 WT) で見られていたポリソーム画分における分布が、Mbf1 D66R 変異体と Mbf1 T69A/D70A/I71A/V72A 変異体で低下していた。また、Mbf1 D66R/T69A/D70A/I71A/V72A 変異体ではさらに分布が低下していた。この結果から、完全ではないが、部分的にリボソームとの相互作用が弱い Mbf1 変異体を構築することができたと考えた。

まず、これら変異体を相補し、レアコドン連続配列を含むレポーターを用いて解析した。*mbf1Δ* 株では RQC や NGD が誘導されないが、Mbf1 WT を相補することで RQC や NGD が誘導される様子が観察された (図 1-3-C lane 4)。変異体を相補した場合は、RQC/NGD の誘導が抑制されており、リボソームとの相互作用が最も弱い Mbf1 D66R/T69A/D70A/I71A/V72A 変異体を相補した場合で最も抑制されていた (図 1-3-C lane 10)。また RFS の誘導については、*mbf1Δ* 株で観察された +1 RFS 産物が、Mbf1 WT を相補すると検出されず、Mbf1 の変異体を相補することで検出された (図 1-3-E)。これらの結果から、Mbf1 のリボソームとの結合がレアコドン連続配列における RQC、NGD の誘導促進と +1 RFS の抑制に必要であることが示唆された。

次に *SDD1* 配列における RQC の誘導効率を解析したが、Mbf1 はこの配列における RQC を促進しないため、変異体を相補してもアレスト産物の量に変化は見られなかった (図 1-3-F)。また、NGD の誘導効率について解析すると、予想に反して、変異体を相補した全ての株で 5' NGD IM の量がわずかに減少したのみで、*mbf1* 欠損変異株の表現型まで減少しなかった (図 1-3-G)。用いた変異体は野生型と比べるとリボソームとの結合が弱い、完全に結合しないわけではない (図 1-3-B)。弱いながらもリボソームと相互作用があるため、

変異体を相補した株と *mbf1Δ* 株の表現型が異なると考察した。そこでリボソームに完全に結合できない変異体の作成を進めることにした。

Mbf1 は uS3 だけでなく mRNA とも相互作用する (図 1-3-H)。そこで、mRNA と相互作用する K46、K47、W48 について電荷の反転とアラニン置換を行った Mbf1 K46D/K47D/W48A 変異体を作成した。また uS3 との相互作用部位に変異を導入し、リボソームとの相互作用が減弱した D66R 変異も組み合わせた Mbf1 K46D/K47D/W48A/D66R 変異体を作成した。ポリソーム解析の結果、これまでの変異体と比較し、ポリソーム画分の分布がさらに低下し、Mbf1 K46D/K47D/W48A/D66R 変異体は、ポリソーム画分にほとんど存在していなかった (図 1-3-I)。そこで、この変異体を用いて *SDD1* 配列における RQC、NGD の誘導効率について再度解析を行った。これまで通り、野生型および変異体を相補してもアレスト産物の量に変化は見られなかった (図 1-3-J)。NGD について解析を行うと、Mbf1 K46D/K47D/W48A 変異体および Mbf1 K46D/K47D/W48A/D66R 変異体で、5' NGD IM が減弱している様子が観察された。このことから、Mbf1 とリボソームとの相互作用が、*SDD1* 配列における NGD の誘導に必要であることが示唆された。

***uS3K108E* 変異株は、*mbf1Δ* 株と同様の表現型を示す**

先行研究より、uS3 K108E 変異体が Mbf1 と同経路で +1 RFS を抑制することが報告されている⁵⁵。Mbf1 の場合と同様に、*uS3 K108E* 変異株も RFS の誘導について解析が行われているが、RQC や NGD における機能は未知のままであった。Mbf1 がそれぞれのイベントの制御を担っていることが明らかになったため、uS3 K108E 変異体についても解析を行うこととした。

まず NGD の誘導効率を調査した。*uS3K108E* 変異株では、レアコドン連続配列および *SDD1* 配列を挿入したレポーター遺伝子由来の 5' NGD IM が検出されず、poly(A) を挿入したレポーター遺伝子由来の 5' NGD IM は検出された (図 1-4-A, D, E)。このことから、uS3

K108E 変異体はレアコドン連続配列と *SDD1* 配列における NGD を促進していることが示唆された。また RQC の誘導効率について解析を行った。その結果、*uS3K108E ltn1Δ* 変異株では、レアコドン連続配列を挿入したレポーター遺伝子由来のアレスト産物が減少し、+1 RFS と推測されるバンドが検出された (図 1-4-B)。一方で、poly(A)配列と *SDD1* 配列のレポーター遺伝子からはアレスト産物が検出された (図 1-4-B, F)。これら結果から、uS3 K108E 変異体はレアコドン連続配列における RQC の促進と RFS の抑制を担っていることが示唆された。

1-4. 考察

本研究では、リボソーム衝突に起因するさまざまなイベントに対し、Mbf1 がどのように作用しているのかを明らかにするために解析を行った。また、細胞内では、多様なリボソーム衝突が生じていることから、停滞の機序が異なるレアコドン連続配列、poly(A)配列、さらには内在性の *SDDI* 配列を用いることで、Mbf1 の機能に一般性があるのかについても検討を行った。

レポーター解析の結果は、以下の通りになった (表 1-1) (図 1-5-A)。レアコドン連続配列では、Mbf1 は RFS を抑制し、RQC と NGD を誘導していた。poly(A)配列では各イベントに対する Mbf1 の寄与は確認されなかった。*SDDI* 配列では、Mbf1 は RFS を抑制し、NGD^{RQC+}を抑制する一方で、RQC と NGD^{RQC-}には寄与していなかった。この結果について、衝突リボソームの構造と、翻訳停滞の安定性の2つから考察を行う。

衝突リボソームの構造

構造解析から、Mbf1 の結合するリボソームは、tRNA が A/P、P/E に位置した回転状態 (rotated) 状態である¹⁴。Mbf1 は、衝突リボソームの mRNA entry channel 付近と相互作用することから³⁶、Mbf1 は rotated 状態を認識している可能性がある。レアコドン配列における衝突リボソームが rotated 状態であるのに対し、poly(A)配列における衝突リボソームは non-rotated 状態である²⁵。このことから、Mbf1 が poly(A)配列におけるイベントの誘導に関与しなかった理由として、そもそも結合しないことが考えられる。

翻訳停滞の安定性

衝突リボソームの安定性について、レアコドン連続配列は比較的不安定である。レアコドン連続配列は、A-site が空であることに起因して、翻訳停滞を誘発する。そのため、+1 RFS が誘導されると、翻訳停滞の原因が解消され、リボソーム衝突も解消される。一方で、poly(A)配列や *SDDI* 配列は、新生ペプチド鎖がリボソームと相互作用することで翻訳停滞が生じ

るため、+1 RFS を誘導しても翻訳停滞の原因は解消されない。*mbf1Δ*株において、レアコドン連続配列では+1 RFS のみが、poly(A)配列では、RQC/NGD のみが生じていた。このことから、先に+1 RFS が生じ、リボソームの衝突状態が解除されると、RQC/NGD が誘導されなくなると推察される。

SDD1 配列では、*mbf1Δ*株で RQC と NGD^{RQC-}が誘導され、NGD^{RQC+}と RFS は誘導されていなかった。NGD^{RQC+}が観察されなかった理由として、Mbf1 が NGD^{RQC+}での mRNA 切断を補助している可能性がある。原核生物において、リボソーム衝突に起因した mRNA の内部切断を担う SmrB は、衝突リボソームの 40S サブユニット同士の相互作用領域に位置し⁵⁸、この位置は、Mbf1 が衝突したリボソームと相互作用する領域とほぼ同じである。また、Mbf1 自体も mRNA と相互作用している。こうしたことから、出芽酵母の mRNA 切断酵素 Cue2 と Mbf1 が同じ位置に存在し、相互作用している可能性がある。Cue2 による mRNA 切断の構造学的解析や、Mbf1 と Cue2 の相互作用に関する解析等を行い、この可能性について検証を行う必要がある。

+1 RFS の誘導効率を求めるレポーター解析において、NGD の mRNA 切断を担う Cue2 を欠損させた株では、レアコドン連続配列、poly(A)配列、*SDD1* 配列の全てにおいて+1 RFS の誘導が促進されていなかった。このことから、これまで主張されていた「NGD が欠失した際に RFS が誘発される」というモデルが誤りであることが明らかになった。一方で、RQC と NGD の誘導に必須な Hel2 を欠損させた場合、レアコドン連続配列において+1 RFS が促進されていた。このことから、+1 RFS を誘発しやすいレアコドン連続配列においては、「RQC や NGD の両方が欠失した際に RFS が誘発される」可能性がある。

第 2 章

uS10 のユビキチン修飾の高次構造とその機能の解明

2-1. 序論

ユビキチン修飾は翻訳後修飾の一つであり、付加反応と脱離反応によって可逆的に制御を受けている。付加反応では、E1、E2、E3 の 3 つの酵素群による連続的な反応が行われる。E1 は、ATP 加水分解エネルギーを用いて、E1 分子のチオール基とユビキチンの C 末端のカルボキシ基間でチオエステル結合を形成する。この反応により活性型となったユビキチンは、E2 酵素に受け渡されたのち、E3 酵素を介して、基質タンパク質のリジン残基に付加される。脱離反応では、脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinase: DUB) によって、エネルギー非依存にユビキチンを除去する。ユビキチンシグナル伝達において、ユビキチン化反応はシグナルの産生に、脱ユビキチン化反応はシグナルの消去、あるいは誤ったユビキチン修飾の編集として機能する。

ユビキチン修飾の特徴として、修飾様式の多様性が挙げられる。基質タンパク質の複数のリジン残基に対してユビキチンを付加するマルチプルユビキチン修飾や、ユビキチンに対しさらにユビキチンが付加するポリユビキチン修飾などがある。ポリユビキチン修飾では、ユビキチン分子内の 7 つのリジン残基もしくは N 末端のアミノ基を介してユビキチン鎖が形成されることから、合計 8 つの連結型が存在する。連結型によってユビキチン修飾の機能は異なり、例えば、K48 型はプロテアソーム依存の分解のシグナルとして、K63 型は DNA 修復のシグナルとして機能していることが広く知られている^{59,60}。このような連結型による機能の違いは、ユビキチン修飾を認識してシグナルを下流へと伝達するコーダー分子が、特定の連結型のみ相互作用するためである^{61,62}。

また、近年の解析により、細胞内には、単独の連結型のみで形成されたユビキチン鎖だけでなく、複数の連結型を組み合わせたユビキチン鎖が存在することが明らかになってきた。例えば、IL-1 β の下流で機能する TRAF6 には、K63 鎖を幹とし、K48 鎖が枝として付加された K63/K48 型分岐鎖が形成されている⁶³。このほかにも、K11/K48 分岐鎖や K29/K48 分

岐鎖、3つの連結型を組み合わせた K63/K11/K48 分岐鎖も存在する⁶⁴⁻⁶⁶。これらの修飾様式は一例に過ぎず、今後、様々な修飾様式が発見されることが期待されている。

ユビキチン修飾は、ホモタイプからヘテロタイプに変換されることで機能を獲得する場合がある。ユビキチン修飾を認識するデコーダー分子と脱ユビキチン化酵素は、特定の連結型を認識するため、ユビキチン鎖の高次構造こそが、機能を決定する。先に挙げた TRAF6 の K63/K48 分岐鎖は、K48 鎖を付加することで脱ユビキチン化酵素による K63 鎖の消去を阻害し、ユビキチンシグナルの持続を促す⁶³。また、K11/K48 分岐鎖は、どちらの連結型もプロテアソーム依存の分解シグナルとして機能することから、分岐鎖になることでデコーダー分子により認識されやすくなり、分解シグナルが増強する⁶⁴。したがって、ユビキチン修飾の機能を正確に理解するためには、基質タンパク質に形成されるユビキチン鎖の高次構造と、デコーダー分子が認識するユビキチン鎖を明らかにする必要がある。

RQC の誘導においては、リボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化が必須である²⁹。E3 酵素 Hel2 は衝突したリボソームを認識し、E2 酵素 Ubc4 とともに、ユビキチン化を行う²⁹。uS10 のユビキチン化サイトは6番目と8番目のリジン残基であり、RQC の誘導に必須な連結型は K63 型である^{15,29,37}。RNA ヘリケース活性を有する Slh1 と、2つのユビキチン結合タンパク質 Cue3 と Rqt4 から成る RQT 複合体は、uS10 のユビキチン修飾を認識し、停滞したリボソームのサブユニット解離を行う^{29,37}。

RQC におけるユビキチン化反応とデコーダー分子の機能について理解が進んでいる一方で、脱ユビキチン化反応については解析が進んでいない。DUB が機能する場面として、1) RQT 複合体によって解離された 40S サブユニットの状態で、不要となったユビキチン修飾を除去する、あるいは、2) 翻訳伸長途中で、誤ったユビキチン修飾を除去する可能性が考えられる。しかし、uS10 のユビキチン修飾を除去する DUB は同定されておらず、DUB による

uS10 のユビキチン修飾の制御システムは不明なままであった。そのため、DUB による RQC の制御機構が存在するのかも未解明なままであった。

先行研究より、uS10 には K48 鎖と K63 鎖が形成されていることが報告されている^{15,29}。このことから、これらのユビキチン鎖を組み合わせた分岐鎖や混合鎖が存在する可能性がある。しかし、uS10 のユビキチン修飾の高次構造については解析が行われておらず、ユビキチン鎖の高次構造を介した RQC の制御機構が存在するかも明らかとなっていない。

2-2. 目的

本研究では、uS10 のユビキチン鎖を除去する DUB の同定を試みた。また、DUB の基質特異性（基質リボソームとユビキチン鎖の連結型）を明らかにするとともに、RQC における DUB の機能の解明を目指した。さらに、uS10 のユビキチン鎖の高次構造を明らかにし、ユビキチン鎖の高次構造を介して RQC の制御が行われているかを検証することとした。

2-3. 結果

出芽酵母の eS10 は Hel2 によってユビキチン修飾されない

まず初めに、RQC の誘導シグナルとして機能するリボソームタンパク質のユビキチン修飾について確認を行った。出芽酵母では uS10 のユビキチン修飾が RQC の誘導に必須であるが²⁹、哺乳類細胞では uS10 だけでなく、eS10 のユビキチン修飾も RQC の誘導に必要である^{13,16,28,38,40,67}。そこで、出芽酵母においても eS10 がユビキチン修飾されているかを検証した。まず、哺乳類細胞の eS10 と、出芽酵母の eS10 (Rps10A と Rps10B) のアミノ酸配列を比較した。その結果、哺乳類細胞の eS10 の C 末端領域は出芽酵母に存在せず、ユビキチン化サイトの K138、K139 も保存されていなかった (図 2-1-A)。次に、出芽酵母の eS10 が Hel2 によってユビキチン化を受けているかについて検証を行った。ウエスタン・ブロットにより、ユビキチン化状態を評価したところ、uS10 は Hel2 の過剰発現によって高分子量のバンドが出現したのに対し、eS10 では変化が見られなかった (図 2-1-B)。

eS10 (Rps10A) の 5 番目のリジン残基がユビキチン化サイトであることが報告されているが⁶⁸、このサイトに Hel2 がユビキチン化するかは不明であった。そこで、このリジン残基をアルギニンに置換した変異体を作成し、ウエスタン・ブロットを行った。しかし、野生型と eS10 K5R 変異体でバンドパターンは変化しておらず、*HEL2* を欠損させた株でも変化は見られなかった (図 2-1-C)。これらの結果から eS10 は Hel2 によるユビキチン修飾を受けていないことが明らかとなった。Hel2 は uS10 のユビキチン修飾のみが行なわれることから、これ以降、uS10 のユビキチン修飾のみに着目して解析を行うこととした。

Ubp2 と Ubp3 が uS10 のユビキチン修飾を除去する

uS10 のユビキチン修飾を制御する DUB を同定するため、研究室に存在する DUB 欠損変異株における uS10 のユビキチン化状態をウエスタン・ブロット法で評価した。その結果、*ubp2*Δ株および *ubp3*Δ株でユビキチン化の亢進が観察された (図 2-2-A)。*ubp2*Δ株ではポリユビキチン化の亢進が、*ubp3*Δ株ではモノもしくはダイユビキチン化が亢進していた。

*ubp2Δubp3Δ*株では、単独欠損株と比較し、相加的にユビキチン化が亢進していた（図 2-2-B）。このことから、Ubp2 と Ubp3 は、異なるユビキチン鎖を標的に、独立に機能していることが示唆された。また Ubp2 と Ubp3 が Hel2 依存のユビキチン鎖を除去しているかを検証した。Hel2 を欠損させると、ユビキチン化が低下したことから、Ubp2 と Ubp3 は Hel2 依存のユビキチン鎖を除去することが示唆された（図 2-2-C）。さらに、*hel2Δubp3Δ*株は、*hel2Δ*株と比較し、ユビキチン化が亢進していたことから、Ubp3 は Hel2 非依存のユビキチン鎖も除去していることが示唆された（図 2-2-C）。

Ubp2 はサブユニット解離後にユビキチン修飾を消去し、Ubp3 は翻訳伸長段階でユビキチン鎖を校正・編集する

同定された DUB らの基質リボソームの特異性を明らかにするため、ポリソーム解析を実施した。野生株では主に 80S 画分以降で uS10 のポリユビキチン化が亢進していた（2-3-A）。*ubp2Δ*株では、40S 画分における uS10 のポリユビキチン化が観察された（図 2-3-B）。このことから Ubp2 が解離した 40S サブユニット上で、ユビキチン鎖を除去していることが示唆された。*ubp3Δ*株では、野生株と比較し、ポリソーム画分におけるダイユビキチン化が亢進していた（図 2-3-C）。したがって、Ubp3 は翻訳途中のリボソームを基質とし、ユビキチン鎖を除去していることが示唆された。また *ubp2Δubp3Δ*株では、40S 画分における uS10 のポリユビキチン化とポリソーム画分におけるダイユビキチン化の亢進が確認され、単独欠損変異株の表現型を相加的に示していた（図 2-3-D）。

つづいて、試験管内反応を用いて、同定された DUB らの基質リボソームの特異性について解析を進めた。また RQC の誘導に必須な K63 鎖に対する特異性についても検討するため、ユビキチンの 63 番目のリジンをアルギニンに置換した *ubK63R* 変異株を使用した。*ubp2ΔubWT* 株に由来する 40S を基質に、野生型の Ubp2 精製タンパク質を添加すると、脱ユビキチン化反応が進行した一方で、脱ユビキチン化活性を不活化した変異体である Ubp2 C745S 精製タンパク質を添加しても反応は進行しなかった（図 2-3-E）。また、*ubK63R* 株

の 40S や、*ubWT* 株と *ubK63R* 株のポリソームを基質にしても反応は進行しなかった (図 2-3-E, F)。これらの結果から、Ubp2 は 40S サブユニット上で、K63 鎖を除去していることが示唆された。Ubp3 についても同様の実験を行った。不活型変異体には Ubp3 C496A 変異体を使用した。解析の結果、40S を基質とした際に反応が進行しなかった一方で (図 2-3-G)、ポリソームを基質とすると、*UbWT* 株と *UbK63R* 株のどちらにおいても反応が進行した (図 2-3-H)。この結果から、Ubp3 は翻訳途中のリボソームを基質とし、K63 型を特異的とせず、ユビキチン鎖を除去していることが示唆された。

Ubp2 は K48 鎖と K63 鎖を、ubp3 は K48 鎖を制御する

各 DUB が制御するユビキチン鎖の連結型について詳細に解析するために、液体クロマトグラフィー質量分析ベースの絶対定量法 Ub-PRM (parallel reaction monitoring) を用いて解析を行った⁶⁹。翻訳途中のリボソームのユビキチン化状態を評価するため、60S サブユニット構成因子 uL23 に付加した FLAG タグで 80S リボソームを精製した。その後、変性条件下で、uS10 に付加した His タグを介して、uS10 を単離精製した (図 2-4-A)。

通常条件下ではユビキチン化状態が少ないこと、精製途中でユビキチン修飾が外れてしまうといった理由から、*Hel2* を過剰発現した株を用いることにした。その結果、ユビキチン化された uS10 の精製に成功した (図 2-4-B)。このサンプルを用いてユビキチン鎖の連結型を定量した (図 2-4-C)。野生株では、K63 型と K48 型が主に存在していた (図 2-4-D)。

Ub-PRM により、連結型を定量したところ、野生株と比較し、*ubp2Δ*株ではK48型とK63型の増加が、*ubp3Δ*株では主にK48型の増加が確認された (図 2-4-E)。このことから、Ubp2 は K48 鎖と K63 鎖を、ubp3 は K48 鎖の制御を行うことが明らかとなった。Ubp2 は K63 鎖を特異的に除去するため、ubp2 は K48 鎖を間接的に制御していることが示唆された。質量分析法に用いたサンプルを、ユビキチン鎖の連結型特異的な抗体で、ウェスタン・ブロットを行った。その結果、*ubp2Δ*株ではポリユビキチン鎖にK48型とK63型が存在することが確認された (図 2-4-D)。また *ubp3Δ*株ではダイユビキチン鎖にK48型とK63型が存在すること

が確認された (図 2-4-D)。

Ubp2 と Ubp3 は uS10 のユビキチン修飾の制御を介して RQC を抑制する

Ubp2 と Ubp3 が RQC に影響を及ぼしているかを検証するため、レポーター解析を実施した。本解析ではレアコドン連続配列を挿入したレポーターを使用した。また RQC の誘導効率の評価は、LTN1 をノックアウトした際に検出されるアレスト産物の蓄積量から算出した。解析の結果、野生株と比較し、*ubp2*Δ株および *ubp3*Δ株でアレスト産物は減少しており、RQC が抑制されていた (図 2-5-A)。また、*ubp2*Δ *ubp3*Δ株では、単独欠損株と比較してアレスト産物が減少し、RQC がさらに抑制されていた (図 2-5-A)。このことから、Ubp2 と Ubp3 は RQC の促進因子であることが示唆された。

RQC の誘導因子を欠損させた変異株は、翻訳阻害剤アニソマイシンに対して感受性を示す²⁹。スポットアッセイにより感受性試験を行ったところ、*ubp2*Δ株はわずかに感受性を示し、*ubp3*Δ株は感受性を示した (図 2-5-B)。また、*ubp2*Δ *ubp3*Δ株では単独欠損株よりも強く感受性を示した (図 2-5-B)。この結果からも、Ubp2 と Ubp3 が RQC の促進因子であることが示唆された。

uS10 にはどのようなユビキチン鎖が形成されているのだろうか

液体クロマトグラフィー質量分析ベースの絶対定量法を用いた解析から、uS10 には主に K48 型と K63 型が形成されていることが明らかとなった。このことから、ユビキチン鎖の高次構造として、ホモメトリックな K48 鎖あるいは K63 鎖、枝分かれを有した分岐鎖、一本鎖に 2 つの連結型が混在した混合鎖、2 つのユビキチン化サイトに別々の連結型でユビキチン鎖が形成されたマルチプル型が想定された (図 2-6-A)。そこで、これら連結様式について検討を行った。

uS10 には K48/K63 型の分岐鎖が形成されていない

はじめに、分岐鎖が形成されているかについて検証を行った。野生型のユビキチンはトリプシン処理によって 48 番目と 63 番目の間にある 54 番目のアルギニンで切断を受ける (図 2-7-A 左)。そのため、分岐鎖が形成されていても、切断により、分岐情報は消失してしまう。そこで、54 番目のアルギニンをアラニンに置換し、切断を免れる Ub R54A 変異体を用いた⁶³。Ub R54A をトリプシン処理すると K48/K63 型の分岐に由来するペプチド断片が生成される (図 2-7-A 右)。これを計測し、分岐の量を測定した。その結果、野生株、*ubp2Δ* 株、*ubp3Δ* 株の全ての株で分岐型が測定されなかった (図 2-7-B)。したがって、uS10 には K48/K63 型の分岐鎖が形成されていないことが明らかになった。

マルチプル型ユビキチン修飾による RQC の制御は存在しない

つぎに、マルチプル型について検討を行った。まず、マルチプルユビキチン修飾を形成できないシングルリジン変異体 uS10 K6R と uS10 K8R のユビキチン化状態をウエスタン・ブロット法により評価した。その結果、どちらのシングルリジン変異体も野生型と同程度にユビキチン化されていた (図 2-8-A)。また、シングルリジン変異体におけるユビキチン鎖の連結型を、連結型特異的な抗体を用いたウエスタン・ブロット法により評価した。K48 型も K63 型も野生型と同様に形成されていた (図 2-8-B)。これらの結果から、マルチプル型に依存せずに K48 鎖と K63 鎖が形成されることが明らかとなった。

シングルリジン変異体の RQC の誘導効率について、レポーター解析により求めた。その結果、シングルリジン変異体で野生型と同程度のアレスト産物が検出された (図 2-8-C)。またアニソマイシンに対する感受性を評価したが、野生株と比較し変化が見られなかった (図 2-8-D)。これらの結果から、マルチプル型ユビキチン修飾による RQC の制御は存在しないことが示唆された。

uS10 に、根本に K48 鎖が、遠位に K63 鎖が形成されている

つづいて、ユビキチン鎖の繋がり方について、UbiCRest を用いて解析を行った。UbiCRest は連結型特異的な脱ユビキチン化酵素により処理したのち、ウエスタン・ブロット法を行うことで、連結型の位置関係が求めることができる解析法である⁷⁰。本解析では K63 型に特異的な脱ユビキチン化酵素 AMSH*と K48 型に特異的な OTUB1*を利用した。また WT と *ubp3Δ*株から精製した uS10 は、ダイ-ユビキチン化までしか検出できず、ユビキチン鎖の高次構造について検討できない。そのため、本解析では、*ubp2Δ*株から精製した uS10 を利用した。AMSH*および OTUB1*を処理したのち、uS10 に付加した HA タグで検出を行った (図 2-9-A lane1-4)。AMSH*処理によりポリユビキチン修飾が減少したことから、ユビキチン鎖の先の方に K63 鎖が形成されていることが示唆された。OTUB1*を処理してもバンドパターンに変化は見られなかった (図 2-9-A lane1, 5-7)。これは、uS10 には主に K63 鎖が形成されており、K48 鎖を切断してもその変化が微小なため確認できなかったためだと推察している。

ユビキチン鎖の繋がり方について詳細に解析を行うため、UbiCRest 後、uS10 を精製し、連結型特異的な抗体を用いてウエスタン・ブロットを行った。その結果、AMSH*処理により、K48 鎖の低分子側へのシフトが確認された (図 2-9-B)。また、シングルリジン変異体を用いても同様の結果が得られた (図 2-9-C)。これらの結果から、uS10 には、根本に K48 鎖、遠位に K63 鎖の K48/K63 型混合鎖が存在することが明らかとなった (図 2-9-D)。

Ub-uS10 を用いることで根本の連結型について解析ができる

uS10 のユビキチン鎖の根本の連結型を解析できるようにするため、uS10 の N 末端にユビキチンを連結させた Ub-uS10 を構築した。質量分析法より、uS10 に形成される連結型は主に K63 型と K48 型であり、また、K29 型もわずかに存在していた (図 2-4-C)。そこで、これらのリジン残基をアルギニン残基に置換した変異型 Ub-uS10 を作成した (図 2-10-A)。この変異体におけるユビキチン化状態をウエスタン・ブロットにより評価した。その結果、

UbWT-uS10 では観察され、K63R 変異体で特異的に消失するバンドと、K29/48R 変異体で特異的に消失するバンドが確認され、K29/48/63R 変異体では全てのバンドが消失した (図 2-10-B)。そのため、各々のバンドを、K63 型、K29 型もしくは K48 型と帰属した。

つづいて、Ub-uS10 を用いてポリソーム解析を行った (図 2-10-C)。K63 型と K29 型/K48 型のバンドを測定した結果、K63 型は他の画分と比較し、ポリソーム画分で増加が見られた一方で、K29 型/K48 型は横ばいであった (図 2-10-D)。この結果から、K63 鎖の形成は翻訳伸長段階で行われていることが示唆された。

Ub-uS10 の K29 鎖は Ufd4 が形成する

Ufd4 は、N 末端にユビキチンを連結させたタンパク質に対して K29 鎖を形成する⁷¹。Ub-uS10 における K29 鎖も Ufd4 が形成することが予想されたため、これを検証することにした。K29 鎖しか形成できない Ub-uS10 K48/63R 変異体において *ufd4* を欠損させると、polyUb のバンドが消失した (図 2-11-A)。このことから Ufd4 が Ub-uS10 に K29 鎖を形成していることが明らかとなった。

つづいて、Ufd4 による RQC の制御を検討した。野生型の uS10 のユビキチン化状態を評価したところ、野生株と *ufd4Δ* で変化が見られなかった (図 2-11-B)。またレポーター解析により RQC の誘導効率を評価したところ、*ufd4Δ* 株と野生株とで変化が見られなかった (図 2-11-C)。これらの結果から、Ufd4 は RQC の制御に関与していないことが示唆された。

Ub-uS10 の K63 鎖は Hel2 が形成する

Hel2 が uS10 に K63 鎖を形成することが報告されていたため^{15,37}、Ub-uS10 の実験系でも検証を行った。K63 鎖しか形成できない Ub-uS10 K29/48R 変異体において *HEL2* を欠損させると、polyUb のバンドが減弱した (図 2-12-A)。このことから Hel2 が Ub-uS10 に K63 鎖を形成していることが明らかとなった。また、Hel2 を過剰発現し、Ub-uS10 のユビキチン化状態の評価を行った。その結果、UbWT-uS10 と UbK48R-uS10 で顕著なユビキチン化

の亢進が観察された一方で、UbK63R-uS10 では僅かにユビキチン化の亢進が見られた（図 2-12-B）。この結果から、Hel2 は K63 鎖を特異的に形成していることが示唆された。

uS10 の根本の K63 鎖が RQC の誘導に必要である

最後に Ub-uS10 の実験系を用いて、uS10 の根本の連結型と RQC の誘導について解析を行った。レポーター解析により RQC の誘導効率を検証したところ、根本に K63 鎖を形成できない *ubK63R-uS10* 変異株で顕著な RQC の抑制が観察された（図 2-13-A）。この結果から uS10 の根本に K63 型ユビキチン鎖が形成されることが RQC の誘導に必須であることが明らかになった。

また、Ub-uS10 の実験系を用いてアニソマイシン感受性試験を実施した。*ubK63R-uS10* 変異株で感受性が見られたことから（図 2-13-B）、uS10 の根本の K63 鎖が翻訳停滞の解消に重要であることが改めて確認された。また *ubK63R-uS10* と比較し、*ubK48/63R-uS10* 変異株で感受性が見られたことから（図 2-13-B）、アニソマイシンに対する応答の際に、uS10 の根本の K48 鎖が何かしらの機能を果たしていることが示唆された。

2-4. 考察

本研究では、遺伝学的スクリーニングにより uS10 の DUB として Ubp2 と Ubp3 を同定した。また Ubp2 が解離した 40S サブユニット上で K63 鎖を除去し、Ubp3 が翻訳伸長段階でユビキチン鎖を除去することを明らかにした。また、レポーター解析により Ubp2 と Ubp3 は RQC 誘導を促進することが明らかになった。また、質量分析法と UbiCRest 法を用いた解析により、uS10 に、分岐がなく、根本に K48 型、遠位に K63 型の混合鎖が存在することを明らかにした。また、ユビキチンと uS10 を連結させた Ub-uS10 を用いた解析から、uS10 の根本の K63 鎖が RQC の誘導に必須であることを示唆された。以上の結果から、Ubp2 と Ubp3 が RQC の誘導に寄与しない K48/K63 型混合鎖の除去することで、RQC の誘導を促進するというモデルを提唱する。

本研究により、Ubp2 と Ubp3 の基質リボソームが異なることが示された。しかし、基質認識の違いについては明らかにできておらず、今後の課題である。先行研究より、40S サブユニット上で eS7 の脱ユビキチン化する Otu2 は、80S サブユニットの状態だとマスクされてしまう領域で 40S サブユニットと結合することが、構造解析から明らかになっている⁷²。この事例のように、構造解析を行うことで Ubp2 や Ubp3 の基質リボソームの特異性が明らかになる可能性がある。また Ubp3 が翻訳伸長中のリボソームを基質としているが、衝突したリボソームを基質としているかは明らかになっていない。Ubp3 が、いつ、どのような翻訳途中のリボソームを標的としているかを明らかにする必要がある。

試験管内脱ユビキチン化反応より、Ubp2 は K63 鎖を特異的に切断することが明らかになった一方で、質量分析法では Ubp2 は K63 鎖だけでなく K48 鎖も制御することが判明した。先行研究より Ubp2 は K63 鎖を切断するが、K48 鎖は切断しないことが報告されており、質量分析法で確認された K48 型の増加は、間接的な表現型であると推察される。UbiCRest の結果より、*ubp2Δ*株で増加した K48 鎖は主に混合鎖に含まれていることが明らかとなっ

た。そのため、K48/K63 型混合鎖が形成されてしまうと、Ubp3 が K48 鎖を切断できなくなる可能性が考えられる。実際、*ubp3Δ*株では短い K48 鎖しか増加していないため、Ubp3 は K48 鎖を除去できるが、K48/K63 型混合鎖は除去できない可能性が高い。以上のことから、細胞内では Ubp2 が K48/K63 型混合鎖の K63 鎖を除去して K48 鎖にし、その後 Ubp3 が K48 鎖を除去する、といった段階的な脱ユビキチン化反応が行われていると推察される (図 2-14-A)。

本研究により、K48/K63 型混合鎖が uS10 に形成されていることが明らかとなった。すでに、K63/K48 鎖、K48/29 鎖、K63/K11/K48 鎖といった複数の連結型を組み合わせた、ヘテロリティックなユビキチン鎖が報告されているが、どのユビキチン鎖も分岐を有している。ゆえに、本研究における分岐のない一本鎖状の混合鎖の発見は初めてである。また、ヘテロリティックなユビキチン鎖の機能として、K63/K48 鎖は脱ユビキチン化酵素の阻害、K48/29 鎖と K63/K11/K48 鎖はプロテアソーム依存の分解シグナルの増強が知られている。K48/K63 混合鎖がデコーダー分子によるユビキチン鎖の認識を阻害するという機能は、報告がなく、新規の機能である。この機能を応用・改変することで、RQC に限らず、別のユビキチン修飾の機能も意図的に抑制できる可能性がある。

N 末端にユビキチンを連結させたタンパク質は、Ufd4 による K29 鎖の形成と Ufd2 による K48 鎖の形成を介して、プロテアソーム依存の分解を受ける (UFD 経路)。Ub-uS10 は Ufd4 によって K29 鎖が形成されていることから、UFD 経路の標的となっている可能性がある。しかし、本研究では Ub-uS10 は安定的に発現していた。これは、Ub-uS10 の発現量が分解の容量を超えている、もしくは Ub-uS10 がリボソームに組み込まれることで分解を免れる、といった理由が考えられる。

Ub-uS10 の実験系を用いることで、Ufd4 が K29 鎖を、Hel2 が K63 鎖を形成することを明

らかにした。Ufd4 も Hel2 も K48 鎖を形成しないことから、別の E3 酵素が K48 鎖を形成していると推察される。今後、K48 鎖を形成する E3 酵素を同定し、K48 鎖が RQC を抑制するかを検証する必要がある。

RQC の誘導には、uS10 の根本の K63 鎖が必須であることを明らかにした。また、UbK29/48/63R uS10 変異体で RQC が誘導されないことから、モノ-ユビキチン修飾では RQC が誘導されないことも明らかになった。さらに、K29 鎖を形成する Ufd4 は RQC に影響を及ぼさないことため、根本の K48 鎖が RQC を抑制している可能性が極めて高い。uS10 のユビキチン修飾を認識とリボソームのサブユニット解離を行う RQT 複合体は、K63 鎖と相互作用する一方で、K48 鎖とは相互作用しない³⁷。したがって、根本に限らず K48 鎖が存在することが、RQT 複合体によるユビキチン鎖の認識を阻害していると推察される。今後、ユビキチン鎖における K48 型の位置を変更できる実験系を構築することで、RQT 複合体が uS10 の根本の連結型を認識しているかについて解析が可能になる。

先行研究により、出芽酵母も哺乳類細胞でも、uS10 の K63 型ユビキチン修飾が RQC の誘導に必須であることが報告されている。そのため、本研究で発見した uS10 の根本の K48 鎖による RQC の誘導制御機構が哺乳類細胞でも保存されている可能性がある。

また、哺乳類細胞では uS10 だけでなく、eS10 のユビキチン修飾も RQC の誘導に必要である。出芽酵母では eS10 のユビキチン化サイトが保存されておらず、eS10 のユビキチン修飾は進化の過程で獲得されたと推察される。哺乳類細胞については、今後、uS10 だけでなく eS10 についても解析を行い、本研究で発見した、ユビキチン鎖の高次構造を介したユビキチン鎖の制御機構が保存されているかを明らかにする必要がある。

脱ユビキチン化酵素の制御に関して、哺乳類細胞では、DUB の USP21 と OTUD3 が、uS10 および eS10 のモノユビキチン修飾を除去することで、RQC を抑制することが報告されている⁷³。USP21 と OTUD3 は Ubp2 や Ubp3 のホモログではないため、哺乳類細胞特異的な制御機構である。哺乳類細胞の uS10 や eS10 に RQC の誘導を阻害するようなユビキチ

ン鎖が形成されていなければ、Ubp2 や Ubp3 のような DUB は不要である。そのため、哺乳類細胞の哺乳類細胞の uS10 や eS10 のユビキチン鎖の高次構造を明らかにすることで、DUB の機能の保存性や相違点について議論できようになると考える。

第 3 章

材料と実験方法

3-1. 材料

3-1-1. 出芽酵母株

本研究では、以下の表 1 に示す出芽酵母株を用いた。

表 3-1 本研究で使した出芽酵母株

Strains name	Genotype & Marker	Source
W303-1a	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Lab. stock, Parent
YKK347	<i>ltn1 Δ::kanMX4</i>	Matsuda <i>et al.</i> , 2014
YKI110	<i>hel2 Δ::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017
YKI765	<i>ltn1 Δ::kanMX4 hel2 Δ::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017
YKK542	<i>asc1 Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> , 2010
YKI310	<i>ltn1 Δ::kanMX4 asc1 Δ::hygMX4</i>	Matsuda <i>et al.</i> , 2014
YST113	<i>mbf1 Δ::hygMX4</i>	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
YST114	<i>ltn1 Δ::kanMX4 mbf1 Δ::hygMX4</i>	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
YKK000	<i>ski2 Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> , 2010
YKI2085	<i>ski2 Δ::natMX4 cue2 Δ::kanMX4</i>	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
YKI112	<i>ski2 Δ::kanMX4 hel2 Δ::natMX4</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019
YKI1726	<i>ski2D::kanMX4 slh1 Δ::natMX4</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019
YST115	<i>ski2 Δ::kanMX4 mbf1 Δ::hygMX4</i>	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
YST183	<i>ski2 Δ::kanMX4 mbf1 Δ::hygMX4 slh1 Δ::natMX4</i>	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
YYM113	<i>cue2 Δ::kanMX4</i>	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
YKK567	<i>ski2 Δ::hygMX4 asc1 Δ::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> , 2010
YKI1655	<i>ski2 Δ::kanMX4 uS10 Δ::natMX4 p414uS10p-uS10</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019
YKI1656	<i>ski2 Δ::kanMX4 uS10 Δ::natMX4 p414uS10p-uS10 K6/8R</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019

YST110	<i>ski2Δ::kanMX4 uS3Δ::natMX4 p414 GPDp-uS3</i>	Tomomatsu et al., 2023
YST111	<i>ski2Δ::kanMX4 uS3Δ::natMX4 p414 GPDp-uS3 K108E</i>	Tomomatsu et al., 2023
YKI1052	<i>uS10Δ::natMX4 p414 uS10p-uS10</i>	Matsuo and Ikeuchi <i>et al.</i> , 2017
YKI1595	<i>ltn1Δ::kanMX4 uS10Δ::natMX4 p414 uS10p-uS10</i>	Matsuo and Ikeuchi <i>et al.</i> , 2017
YKI1053	<i>uS10Δ::natMX4 p414 uS10p-uS10 K6/8R</i>	Matsuo and Ikeuchi <i>et al.</i> , 2017
YKI1596	<i>ltn1Δ::kanMX4 uS10Δ::natMX4 p414 uS10p-uS10 K6/8R</i>	Matsuo and Ikeuchi <i>et al.</i> , 2017
YST104	<i>uS3Δ::natMX4 p414 GPDp-uS3</i>	Tomomatsu et al., 2023
YST107	<i>ltn1Δ::kanMX4 uS3Δ::natMX4 p414 GPDp-uS3</i>	Tomomatsu et al., 2023
YST105	<i>uS3Δ::natMX4 p414 GPDp-uS3 K108E</i>	Tomomatsu et al., 2023
YST108	<i>ltn1Δ::kanMX4 uS3Δ::natMX4 p414 GPDp-uS3 K108E</i>	Tomomatsu et al., 2023
	BY4741 WT	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp1Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp2Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp3Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp4Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp5Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp6Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp7Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp8Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp9Δ::KAN</i>	Lab. Stock

	<i>BY4741 ubp11Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp12Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp13Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp14Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp15Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 ubp16Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 otu1Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 otu2Δ::KAN</i>	Lab. Stock
	<i>BY4741 yuh1Δ::KAN</i>	Lab. Stock
YST034	<i>ubp2Δ::kanMX4</i>	This study
YKI1058	<i>ubp3Δ::hygMX4</i>	This study
YST045	<i>ubp2Δ::kanMX4 ubp3Δ::hygMX4</i>	This study
YST029	<i>ltn1Δ::natMX4 ubp2Δ::kanMX4</i>	This study
YAI027	<i>ltn1D::kanMX4 ubp3Δ::hygMX4</i>	This study
YST003	<i>hel2Δ::natMX4 ubp2Δ::hygMX4</i>	This study
YST054	<i>ubp2Δ::hygMX4 hel2Δ::natMX4 ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
YAI026	<i>ubp3Δ::hygMX4 hel2Δ::natMX4</i>	This study
YST055	<i>ubp3Δ::hygMX4 hel2Δ::natMX4 ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
YST045	<i>ubp2Δ::kanMX4 ubp3Δ::hygMX4</i>	This study
YST056	<i>ubp2Δ::kanMX4 ubp3Δ::hygMX4 ltn1Δ::natMX4</i>	This study
YMY46	<i>uS10-3HA::hisMX6</i>	Ikeuchi et al., 2019
YSG012	<i>eS10A-3HA::hisMX6</i>	Ikeuchi et al., 2019
YSG013	<i>eS10B-3HA::hisMX6</i>	Ikeuchi et al., 2019

YSS2191	<i>MATa lys2-801 leu2-3,2-112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1 ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2::ura3 ubi3-Δub-2 ubi4Δ2::LEU2 (YEpKan-TEF1p-kozak-yUb-CYC1t) (pUB100)</i>	Ikeuchi et al., 2019, parental strain is SUB328 (DF5, Finley Lab.)
YSS2192	<i>MATa lys2-801 leu2-3,2-112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1 ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2::ura3 ubi3-Δub-2 ubi4Δ2::LEU2 (YepKan-TEF1p-kozak-yUbK63R-CYC1t) (pUB100)</i>	Ikeuchi et al., 2019, parental strain is SUB328 (DF5, Finley Lab.)
YST059	YSS2191 <i>ubp2Δ::natMX4</i>	This study
YST060	YSS2192 <i>ubp2Δ::natMX4</i>	This study
YST061	YSS2191 <i>ubp3Δ::natMX4</i>	This study
YST062	YSS2192 <i>ubp3Δ::natMX4</i>	This study
YST094	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-uS10-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST101	<i>uS10Δ::natMX4 ubp2Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST102	<i>uS10Δ::natMX4 ubp3Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST209	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-uS10-3HA-CYCt</i>	This study
YST210	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-uS10K6/8R-3HA-CYCt</i>	This study
YST211	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-uS10K6R-3HA-CYCt</i>	This study
YST212	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-uS10K8R-3HA-CYCt</i>	This study
YST217	<i>uS10Δ::natMX4 ltn1Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10-3HA-CYCt</i>	This study
YST218	<i>uS10Δ::natMX4 ltn1Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10K6/8R-3HA-CYCt</i>	This study
YST219	<i>uS10Δ::natMX4 ltn1Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10K6R-3HA-CYCt</i>	This study
YST220	<i>uS10Δ::natMX4 ltn1Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10K8R-3HA-CYCt</i>	This study

YST143	<i>MATa lys2-801 leu2-3,2-112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1 ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2::ura3 ubi3-Δ ub-2 ubi4Δ2::LEU2 (YEPhph-TEF1p-koza-yUbr54A-CYCt) uS10Δ::natMX4 p416uS10p-uS10-3HA-6His-CYCt</i>	This study, parental strain is SUB328 (DF5, Finley Lab.)
YST144	YST143 <i>ubp2Δ::kanMX4 p416uS10p-uS10-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST235	YST143 <i>ubp3Δ::kanMX4 p416uS10p-uS10-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST227	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-uS10K6R-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST228	<i>uS10Δ::natMX4 ubp2Δ::kanMX4 p414uS10p-uS10K6R-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST285	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST286	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb K48R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST287	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST288	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb K48R K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST327	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb K29R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST328	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb K29R K48R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
YST329	<i>uS10Δ::natMX4 p414uS10p-yUb K29R K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study

YST330	<i>uS10Δ::natMX4</i> p414 <i>uS10p-yUb K29R K48R K63R G76V-uS10 K8R</i> 8-121-3HA-6His-CYCt	This study
YST337	YST285 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST338	YST286 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST339	YST287 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST340	YST288 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST341	YST327 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST342	YST328 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST343	YST329 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST344	YST330 <i>ufd4Δ::kanMX4</i>	This study
YST203	<i>ufd4Δ::natMX4</i>	This study
YST300	YST285 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST301	YST286 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST302	YST287 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST303	YST288 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST352	YST327 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST353	YST328 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST354	YST329 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST355	YST330 <i>hel2Δ::kanMX4</i>	This study
YST292	YST285 <i>ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
YST293	YST286 <i>ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
YST294	YST287 <i>ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
YST295	YST288 <i>ltn1Δ::kanMX4</i>	This study
YST331	YST327 <i>ltn1Δ::kanMX4</i>	This study

YST332	YST328 <i>ltn1</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	This study
YST333	YST329 <i>ltn1</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	This study
YST334	YST330 <i>ltn1</i> Δ :: <i>kanMX4</i>	This study

3-1-2. プラスミド

本研究では、以下の表 2 に示すプラスミドを用いた。

表 3-2 本研究で使⽤したプラスミド

Plasmid name	Feature	Source
p415GPDp	<i>CEN6, LEU2, GPD promoter</i>	Mumberg <i>et al.</i> , 1995
pLD003	p416GPDp-GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3	Dimitrova <i>et al.</i> , 2009
pNK003	p416GPDp-R(CGA)6-2HA-FLAG-HIS3	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pNK004	p416GPDp-R(CGA)6-2HA+G-FLAG-HIS3	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pLD001	p416GPDp-GFP-K(AAA)12-FLAG-HIS3	Dimitrova <i>et al.</i> , 2009
pST059	p416GPDp-GFP-K(AAA)12+G-FLAG-HIS3	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pAW123	p416GPDp-HA-SDD1-V5-FLAG	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST053	p416GPDp-GFP-SDD1(196-213)-FLAG-HIS3	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST054	p416GPDp-GFP-SDD1(196-213)+G-FLAG-HIS3	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST103	p416GPDp-HA-SDD1 L(UUG)214L(CUU)-V5-FLAG	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST073	p415MBF1p-MBF1-HA	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST085	p415MBF1p-MBF1D66R-HA	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST125	p415MBF1p-MBF1 T69AD70AI71AV72A-HA	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST127	p415MBF1p-MBF1 D65R T69AD70AI71AV72A-HA	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST087	p415MBF1p-MBF1 K46D/K47D/Y48A-HA	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST088	p415MBF1p-MBF1K46D/K47D/Y48A/D66R-HA	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pKI46	p414GPDp-uS3	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST060	p414GPDp-uS3 K108E	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023
pST061	p414GPDp-uS3 R116/117A	Tomomatsu <i>et al.</i> , 2023

pKI124	p414uS10p-uS10	Lab. stock
pKI140	p414uS10p-uS10 K6/8R	Lab. stock
pST001	p415uS10p-uS10-3HA-CYCt	This study
pKI19	p415GPDp-HEL2-FLAG-CYCt	Matsuo <i>et al.</i> , 2017
pST014	p416uS10p-uS10-3HA-CYCt	This study
pST051	p414uS10p-uS10-3HA-6xHis-CYCt	This study
pST069	p415GPDp-Hel2-V5-CYCt	This study
pKI191	p416GPDp-uL23-FLAG-CYCt	This study
pKI236	p414uS10p-uS10-3HA-CYCt	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019
pKI237	p414uS10p-uS10 K6R K8R-3HA-CYCt	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019
pKI238	p414uS10p-uS10 K6R-3HA-CYCt	This study
pKI239	p414uS10p-uS10 K8R-3HA-CYCt	This study
pST081	p416uS10p-uS10-3HA-6xHis-CYCt	This study
pST097	p413GPDp-Hel2-V5-CYCt	This study
pST109	pRS317GPDp-RPL25-FLAG-CYCt	This study
pST083	p415GPDpUbp2-TEV-3xFLAG-CYC1t	This study
pST045	p415GPDp-ubp2(C745S)-TEV-3xFLAG-CYCt	This study
pST006	p415GPDp-ubp3-TEV-3xFLAG-CYCt	This study
pST046	p415GPDp-ubp3(C496A)-TEV-3xFLAG-CYCt	This study
	pOPINB-AMSH*	Michel <i>et al.</i> , 2015
	pOPINB-OTUB1*	Michel <i>et al.</i> , 2015
pST137	p414uS10p-uS10 K6R -3HA-6xHis-CYCt	This study
	YepKan-TEF1p-kozak-yUb-CYC1t	Sugiyama <i>et al.</i> , 2019
	YepKan-TEF1p-kozak-yUbK63R-CYC1t	Sugiyama <i>et al.</i> , 2019

	<i>YepHph-TEF1p-kozak-yUbR54A-CYCt</i>	This study
pST158	<i>p414uS10p-yUb G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST159	<i>p414uS10p-yUb K29R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST160	<i>p414uS10p-yUb K48R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST161	<i>p414uS10p-yUb K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST162	<i>p414uS10p-yUb K29R K48R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST163	<i>p414uS10p-yUb K29R K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST164	<i>p414uS10p-yUb K48R K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study
pST165	<i>p414uS10p-yUb K29R K48R K63R G76V-uS10 K8R 8-121-3HA-6His-CYCt</i>	This study

3-1-3. 抗体、化学物質、ペプチド、組換えタンパク質

本研究では、以下の表 3 に示す抗体、化学物質、ペプチド、組換えタンパク質等を用いた。

表 3-3 本研究で使用した抗体、化学物質、ペプチド、組換えタンパク質等

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-HA-Peroxidase	Roche	Cat# 12013819001; RRID: AB_390917
Anti-FLAG M2 antibody	Sigma	Cat# F1804-1MG; RRID: AB_262044
GFP(B-2) mouse monoclonal IgG2a	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-9996, RRID:AB_627695
Anti-eEF2 antibody	Lab stock	N/A
Anti-eEF3 antibody	Lab stock	N/A
Mouse Anti-Viral V5-TAG monoclonal antibody, Unconjugated, Clone SV5-Pk1	Bio-Rad	Cat# MCA1360, RRID:AB_322378
Anti-Ubiquitin (P4D1) HRP	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-0817, RRID:AB_628423
Anti-K48 Ubiquitin antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 8081; RRID:AB_1587580
Anti-K63 Ubiquitin antibody	EMD Millipore	Cat# 05-1308; RRID:AB_10859893
ECL Anti-mouse IgG, horseradish Peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA931V; RRID: AB_772210
ECL Anti-rabbit IgG, horseradish Peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA934V; RRID: AB_772206
Bacterial strains		
E. coli. Rosetta-gami 2 (DE3)	Novagen	Cat# 71351

Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
G-418 Sulfate	Wako	Cat# 074-05963
Hygromycin B	Wako	Cat# 085-06153
LEXSY-NTC, Nourseothricin	JenaBioScience	Cat# AB-101S
Cycloheximide	Nacalai tesque	Cat# 06741-04
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Cat# 11836170001
Anti DYKDDDDK tag, Antibody Beads	Wako	Cat# 016-22784
DYKDDDDK peptide	GenScript	N/A
5' DNA Adenylation Kit	NEB	Cat# E2610
T4 Polynucleotide Kinase	NEB	Cat# M0201
T4 RNA Ligase 2, Truncated	NEB	Cat# M0242
IgG-Sepharose 6 Fast Flow	Cytiva	Cat# GE17-0969-01
Ni-NTA agarose	QIAGEN	Cat# 1018240
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside (IPTG), Dioxane free	Nacalai tesque	Cat# 19742-94
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare	Cat# 17-1756-05
PreScission Protease	GE Healthcare	Cat# 27084301
Silver stain KANTO III	KANTO CHEMICAL	Cat#37937-96

Critical commercial assays		
ImmunoStar LD	Fujifilm	Cat# 290-69904
<i>Deposited data</i>		
Mbf1-ribosome complex	sinha et al (2020)	EMDB: EMD-11457; PDB 6ZVI
Software and algorithms		
UCSF Chimera X 1.2	Goddard et al. (2018)62	https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/
ImageJ	Schneider et al. (2012), Abramoff et al. (2004)	https://imagej.nih.gov/ij/

3-2. 実験方法

3-2-1. 培地

出芽酵母用

YPD 培地：1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose

SCD 培地：yeast nitrogen base without amino acids 6.7g/L, dropout mix 1.3g/L, 2% glucose

大腸菌用

LB 培地：yeast extract 5g/L, tryptone 10g/L, NaCl 10g/L

2xTY 培地：yeast extract 10g/L, tryptone 16g/L, NaCl 5g/L

3-2-2. 遺伝子欠損株および、タグ付加株の作成

PCR 産物を用いた作成法を利用し、遺伝子欠損株とタグ付加株の作成を行った。

3-2-3. RNA の抽出

凍結した菌体を RNA buffer 300uL に懸濁し、RNA 用フェノール 300uL を加え vortex(10sec)し、65°Cに 5 分間静置したのち 5 分間氷冷した。遠心分離(130,000rpm, 5min, RT)し、上清に対して再度 RNA 用フェノール 300uL を加え同様の操作を行った。

上清を取り除き、300uL の RNA 用フェノール/クロロホルムを加え、vortex(10sec)したのち遠心分離(130,000rpm, 5min, RT)した。この上清に 300uL の RNA 用 PCI を加え、vortex(10sec)したのち遠心分離(130,000rpm, 5min, RT)した。上清を分取しエタノール沈殿を行い、RNA ペレットを 60uL の DEPC 処理水に溶かした。

RNA buffer: 30mM NaCl, 20mM Tris-HCl(pH9.5), 10mM EDTA, 1% SDS

PCI: フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、量比 25:24:1 の混合物

3-2-4. Northern Blotting

RNA 試料の濃度を nondrop で測定後、1.5ug/6uL となるように調整した。ここに RNA sample buffer を添加し、74°Cで 10 分加熱し、氷冷 5 分を行った。これを MOPS 2%アガロースゲルにアプライし電気泳動を行った。泳動後、20xSSC を用いたキャピラリーブロッキングにより RNA をメンブ lane に転写させ、UV crosslinker (GE ヘルスケ) により固定した。メンブ lane を 2 xSSC で洗浄したのち、Digoxigenin (DIG) -11dUTP で標識した目的の RNA プロブを用いて 50°Cで一晩ハイブリダイゼーションした。メンブ lane を Wash buffer1 で 1 度、Wash buffer2 で 2 度洗浄し、マ lane 酸 buffer に希釈した Blocking reagent でブロッキングし、抗 DIG-AP 抗体と反応させた。Wash buffer3 でメンブ lane を 3 度洗浄後、平衡化 buffer でメンブ lane を平衡化させた。CDP-Star detection kit (Roche) でメンブ lane を反応させたのち LAS-4000 mini (FUJIFILM) を用いて検出を行った。

RNA sample buffer: 58% deionized formamide, 12% MOPS buffer, 7% formaldehyde, 6% glycerol, 1.2mM EDTA pH8.0, 0.006% w/v BPB, 0.006% w/v Xylene cyanol

10xMOPS buffer (pH7.0): 0.2M MOPS, 50mM NaOAc, 10mM EDTA

20xSSC: 3M NaCl, 0.3M Sodium citrate

Wash buffer1: 2xSSC, 0.1% SDS

Wash buffer2: 0.1xSSC, 0.1% SDS

Wash buffer3: 0.1M maleic acid, 0.3% Tween-20

平衡化 buffer: 0.1M Tris-HCl(pH9.5), 0.1M NaCl

3-2-5. Spot assay

定常期まで培養した酵母を OD600=0.3 になるように希釈し、さらにこれを 1/10 倍に希釈した。これらの希釈液を 10 uL ずつプレートにスポットした。プレートは 30°C で 2 日間静置した。

3-2-6. タンパク質の抽出法

Log phase (OD600=0.5-0.7) に入った酵母を集菌し、よく冷やした 500uL の TCA buffer で懸濁した。20% TCA 500 uL と 0.5 mm zirconia/silica beads 500uL とともに 30 秒間の Vortex を 3 回行い、上清を新しい 1.5mL チューブに移した。0.5 mm zirconia/silica beads を含む 1.5mL チューブに対して TCA buffer を 500uL 加え 30 秒間の Vortex を 1 回行い、上清を 1.5mL チューブにまとめた。これを遠心分離し、上清を完全に取り除き、1xSDS sample buffer を (150/OD600) uL 添加し、よく懸濁させた。加熱処理後(100°C 10 min)、遠心分離(13,000rpm, 10 min, RT)を行い、上清を SDS-PAGE のサンプルとした。

3-2-7. Western blotting

タンパク質試料を 10% または 12% SDS-PAGE あるいは 15% Neu-PAGE で電気泳動した。泳動後ゲルを脱イオン交換水ですすいだ後 Cathode buffer で平衡化した。PVDF メンブ lane はメタノールで親水化したのち Anode buffer2 で平衡化した。Electro-blotting によってゲルのタンパク質をメンブ lane へと転写した。転写後メンブ lane を Wash buffer に溶かしたスキムミルクでブロッキングした。Wash buffer で洗浄後 (10min 3times)、1 次抗体

反応を行った。Wash buffer で洗浄後 (10min 3times)、続けて二次抗体反応を行った。Wash buffer で洗浄したのち (10min 3times) Immunostar (WAKO) によってメンブ lane を処理し LAS-4000 (FUJIFILM) を用いて検出した。

Anode1 buffer : 20% methanol, 300mM Tris-HCl(pH10.4)

Anode2 buffer : 20% methanol, 25mM Tris-HCl(pH10.4)

Cathode buffer : 0.04M Glycin, 20% methanol, 25mM Tris-HCl(pH9.4)

Wash buffer : 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH7.5), 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20

3-2-8. ポリソーム解析

OD₆₀₀=0.6 まで培養した酵母を、0.1g/mL Cycloheximide で 5 分間処理し、菌体を回収し液体窒素によって凍結させた。乳棒と乳鉢を用いて菌体を液体窒素下で破碎し、Lysis buffer を 600 μ L 加え、4°C で溶解させた。4°C 10,000 g で 10min 遠心し、上清を 1.7 mL チューブに移した。さらに 4°C 20,000 g で 15 分遠心し、新しい 1.7mL チューブに移しこれを抽出液とした。この抽出液を RNA 量が 2 mg となる量を、Gradient master (BIO COMP) により作成した 10-50 %スクロース溶液に重層した。これを P28S rotor で 27,000 rpm 3 hrs 4°C、または SW40 rotor で 40,000 rpm 1.5 hours、4°C により分離し、BIO-MINI UV MONITOR (ATTO) で A260 の測定および Position Gradient Fractionator (TOWA LABO) でポリソームの分画を行った。

シヨ糖密度勾配遠心法によって画分した各サンプルに最終濃度が 10%となるように TCA を添加した。10 秒間 Vortex した後、氷上に 30 分間静置し、4°C 14,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を取り除き、さらに 4°C 14,000 rpm で 2 分間遠心し、完全に上清を取り除いた。Acetone で洗浄したのち、ここに 1×sample buffer を添加し、100°C で 10 分間加熱、13,000 rpm で遠心したものをサンプルとした。

Lysis buffer: 20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 1mM PMSF, 1 tablet/10 mL cOmplete mini EDTA-free

10% sucrose solution: 10% sucrose, 10 mM Tris, 70 mM NH₄OAc, 4 mM Mg(OAc)₂

50% sucrose solution: 50% sucrose, 10 mM Tris, 70 mM NH₄OAc, 4 mM Mg(OAc)₂

3-2-9. uS10 の精製

ユビキチン化 uS10 は、uL23-FLAG および 6His タグ付き uS10 発現プラスミドを使用した 2 段階のアフィニティー精製方法によって精製した。

目的の株におけるマーカーとなるアミノ酸を除いた SC 液体培地で OD₆₀₀=0.6 まで培養した後、菌体を回収し液体窒素によって凍結させた。乳棒と乳鉢を用いて菌体を液体窒素下で破碎し、LB150 を加え、4 °C で溶解させた。4 °C 40,000 g で 30 分遠心し、上清を 15 mL チューブに移した。LB150 で 3 回洗浄した 200 μL FLAG beads (bed volume) を、15 mL チューブに加え、4°C で 60 分間インキュベートした。インキュベート後、LB150 で 7 回洗浄した。その後、100 μg/mL FLAG ペプチド (GenScript) を含む 600 μL の LB150 と 4°C で 1 時間インキュベートすることにより、リボソームをビーズから溶出した。この溶出は 2 度行った。

溶出したリボソームを変性条件 (50mM Tris-HCl pH7.5、300mM NaCl、20mM イミダゾール、6M グアニジン-HCl、2mM 2-メルカプトエタノール、0.01% NP-40) でインキュベートした。予め平衡化した 50 μL の Ni-NTA アガロース (QIAGEN) とともに 4°C で 1 時間インキュベートした。Wash buffer 1 による洗浄を 2 回行い、Wash buffer 2 による洗浄を 2 回行った。Elution buffer を 600 uL 加え、4° C で 1 時間インキュベートし uS10 を溶出した。溶出された uS10 を TCA 沈殿法により濃縮し、サンプルバッファーで溶解した。

LB150 : 50 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、10 mM MgCl₂、5 mM 2-メルカプトエタ

ノール、0.05% NP-40)

Wash Buffer 1 : (50 mM Tris-HCl pH7.5、300 mM NaCl、10 mM MgCl₂、20 mM イミダゾール、6 M グアニジン-HCl、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.05% NP-40)

Wash Buffer 2 : (50 mM Tris-HCl pH7.5、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、10 mM イミダゾール、2 mM 2-メルカプトエタノール、0.01% NP-40)

Elution buffer : (50 mM トリス-HCl pH7.5、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、300 mM イミダゾール、2 mM 2-メルカプトエタノール、0.01% NP-40)

3-2-10. Ubp2 と Ubp3 の精製

目的の株におけるマーカーとなるアミノ酸を除いた SC 液体培地で OD₆₀₀=0.6 まで培養した後、菌体を回収し液体窒素によって凍結させた。乳棒と乳鉢を用いて菌体を液体窒素下で破碎し、Lysis buffer を 10 mL 加え、4 °C で溶解させた。4 °C 40,000 g で 30 分遠心し、上清を 15 mL チューブに移した。Wash buffer で 3 回洗浄した 100 µL FLAG beads (bed volume) を、15 mL チューブに加え、4°C で 60 分間インキュベートした。インキュベート後、Wash buffer で 5 回洗浄した。さらに Wash buffer と Elution buffer を等量ずつ添加し、2 度洗浄した後、Elution buffer で 2 度洗浄した。Elution buffer 100 µL と 2.5 mg/mL FLAG peptide 4 µL の添加し、4°C で 1 時間インキュベートし、結合タンパク質を溶出した。4 °C 1,200 g で遠心し、mobicol を用いて上清を新しい 1.5mL チューブに回収した。

Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.0075 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 tablet/50 mL cOmplete mini EDTA free

Wash buffer: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.0075 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF

Elution buffer: 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF

3-2-11. AMSH*と OTUB1*の精製

AMSH*および OTUB1* は大腸菌 Rossetta-gami 2 (DE3) (Novagen) を用いて精製した。大腸菌細胞を、50 ug/mL カナマイシンおよび 35 ug/mL クロラムフェニコールを添加した 2xTY 培地 200 L で 37 ° C で OD600 = 0.3 まで増殖させ、18 ° C に冷却し、0.4 mM IPTG で誘導し、添加 16 時間後に集菌をした。大腸菌細胞を、cComplete Mini EDTA-free (Roche) (1 錠/10 mL) を含む 10 mL の Lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4、150 mM NaCl、2 mM β -メルカプトエタノール) を用いて超音波により溶解しました。溶解液を 10,000 x g、4 ° C で 10 分間遠心分離し、続いて上清を 40,000 x g、4 ° C で 30 分間に遠心分離した。ここに、Lysis buffer で予め平衡化した 200 μ L の Ni-NTA アガロース (Q I A G E N) を加え、1 時間インキュベートした。Lysis buffer で 5 回洗浄し、200 uL の Elution buffer (50 mM Tris pH 7.4、150 mM NaCl、2 mM β -メルカプトエタノール、8 uL PreScission protease (GE Healthcare)) を使用して 4 ° C で 16 時間溶出を行った。PreScission protease は Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) によって除去した。

3-2-12. 試験管内脱ユビキチン化反応

シヨ糖密度勾配遠心によって画分した 40S、ポリソーム画分 400uL を 1.5mL チューブに移した。ここに精製した脱ユビキチン化酵素、もしくは脱ユビキチン化酵素 不活性型を添加し、よく混ぜ、30°Cに一定時間静置した。TCA 沈殿法を用いてタンパク質をペレットにし、アセトンで洗浄後、1×sample buffer を添加し、100 °Cで 10 分間加熱したものをサンプルとした。

3-2-13. UbiCRest

25-100 nM AMSH*もしくは 50-200 nM OTUB1*を添加し、37°Cで 1 時間反応を行った。4×sample buffer を添加し、100 °Cで 10 分間加熱したものをサンプルとした。

3-2-14. CBB 染色

ゲルを染色液に 1 時間浸すことで染色を行い、脱色液およびイオン交換水を用いて脱色を行った。撮影には EPSON GT-X900 を使用した。

染色液：2.5g/L Coomassie Brilliant Blue R-250, 100 mL/L CH₃COOH, 900 mL/L 50v/v% MeOH

脱色液：100 mL/L CH₃COOH, 900 mL/L 50v/v% MeOH

3-2-15. 銀染色

銀染色には Silver Stain KANTO III (KANTO CHEMICAL CO., INC.)を利用した。

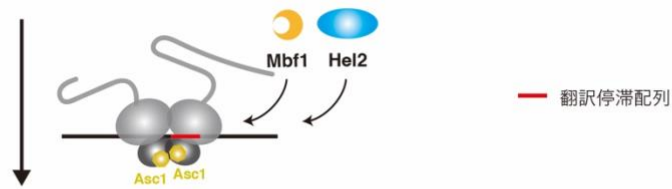
3-2-16. 質量分析法

SDS-PAGE を使用して分析物を分離した後、ゲル片を 50 mM AMBC/30% アセトニトリル (ACN) で洗浄し、次に 50 mM AMBC/50% ACN で 2 時間洗浄した。ゲル片を 100% ACN で脱水し、50 mM AMBC/5% ACN、pH 8.0 中で sequence-grade trypsin (Promega) (20 ng/ μ L)を使用し、37°C で 16 時間、タンパク質を消化した。消化されたペプチドを、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)/80% ACN で 3 回抽出した。AQUA ペプチドの混合物 (25 fmol/注射) を抽出ペプチドに添加し、濃縮ペプチドを 0.05% H₂O₂ を含む 0.1% TFA 20 μ L で希釈した。分岐および非分岐 K48/K63 結合を定量化するために、ペプチドを 50 mM AMBC で希釈して中和し、2 ng/ μ L 組換えグルタミニルペプチドシクロトランスフェラーゼ (QPCT) (R&D Systems) を含む 20 μ L 反応液中で、37°C、6 時間インキュベートした。続いて、C18チップ (Thermo Scientific) およびGL-GCチップ (GL Scientific) を使用してペプチドを精製した。LC-MS/MS 分析では、Easy nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific) を、ナノエレクトロスプレー イオン源 (Thermo Fisher Scientific) を備えた Orbitrap Fusion LUMOS (Thermo

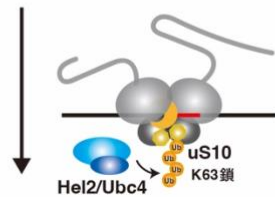
Fisher Scientific) にインラインで接続した。55 分間のグラジエント (溶媒 A、0.1% FA; B、80% ACN/0.1% FA) を使用し、ペプチドを C18 分析カラム (IonOpticks、Aurora シリーズ エミッター カラム、AUR2-25075C18A 25 cm × 75 μ m 1.6 μ m FSC C18、nanoZero フィッティング付き) で分離した。MS/MS スペクトルのターゲット取得 (並行反応モニタリング) は、Xcalibur ソフトウェアを使用してターゲット MS/MS モードで動作する Orbitrap Fusion LUMOS 機器を使用して実行した。ペプチドは高エネルギー衝突解離 (正規化衝突エネルギー 28) を使用してフラグメント化し、フラグメントイオンは Orbitrap を使用して検出した。データは PinPoint ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を使用して処理し、選択されたフラグメント イオンの曲線下積分面積に基づいてペプチド存在量を計算した。

図と表

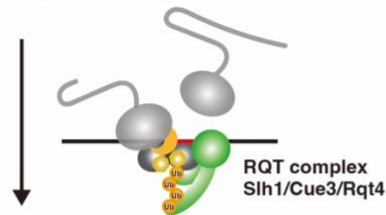
衝突リボソームの認識



停滞したリボソームのユビキチン化



停滞したリボソームのサブユニット解離



解離した 60S サブユニット上の新生ペプチド鎖の分解

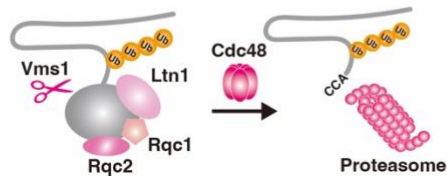
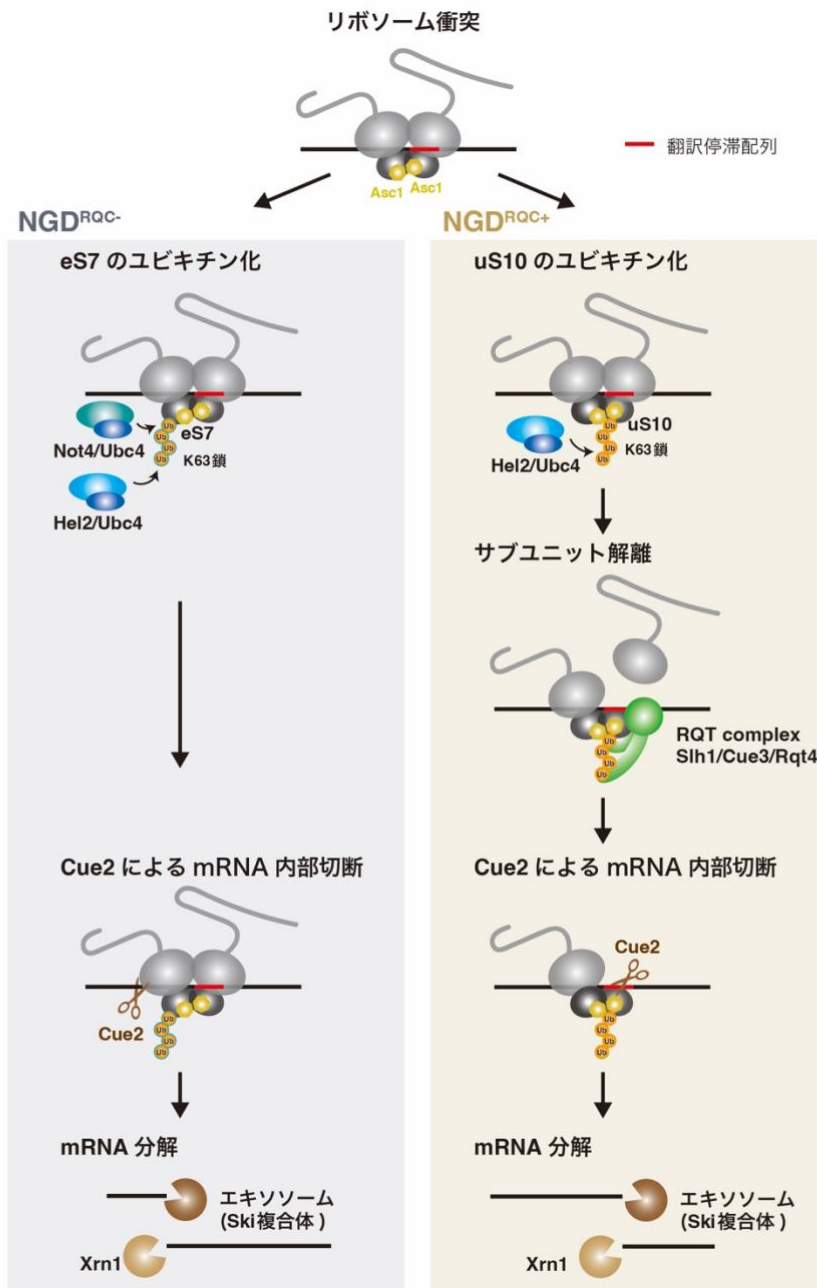


図1. RQC の分子メカニズム

衝突したリボソームは Mbf1 及び Hel2 によって認識される。Hel2 は E2 酵素 Ubc4 とともにリボソームタンパク質 uS10 を K63 型ポリユビキチン修飾し、RQT 複合体によるリボソームのサブユニット解離を引き起こす。解離した 60S サブユニット上の新生ペプチド鎖は、最終的にプロテアソーム依存の分解へと導かれる。



図式. NGD の分子メカニズム

NGD^{RQC+} : RQC と共役して行われる NGD。RQT 複合体が停滞したリボソームをサブユニット解離したのち、エンドヌクレアーゼ Cue2 が mRNA を内部切断する。mRNA 断片は、エキソソームと Xrn1 によって分解される。

NGD^{RQC} : RQC と共役せずに行われる NGD。リボソームのサブユニット解離が行われ
ない場合、衝突したリボソームの外側で Cue2 による mRNA 切断が行われる。mRNA 断片
は、エキソソームと Xrn1 によって分解される。

A

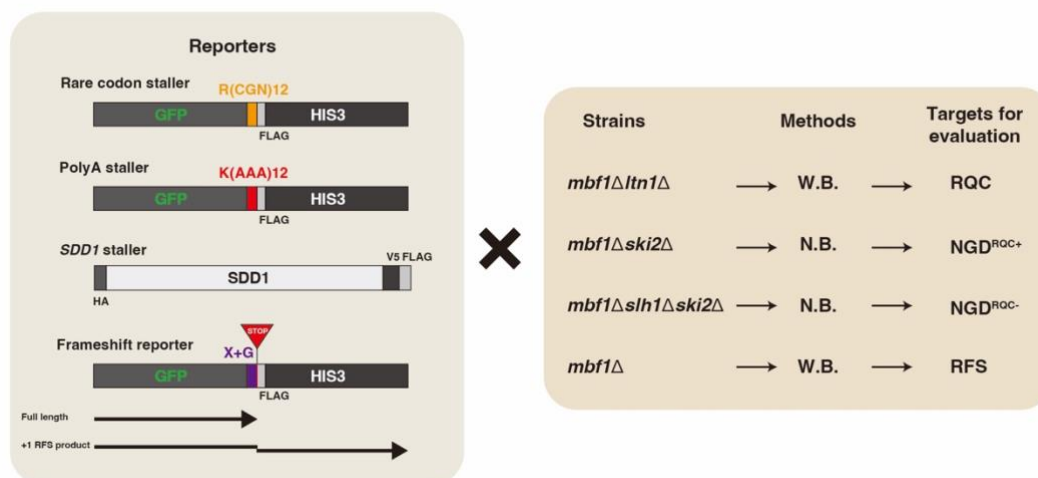


図 1.1 解析方法の概要

A. 本解析では、左に示すレポーターを使用した。レアコドン連続配列と poly(A)配列による翻訳停滞を解析するために、*GFP* と *HIS3* の間にそれぞれの配列を挿入したレポーターを用いた。*SDD1* 配列による翻訳停滞の解析には、全長の *SDD1* 配列の N 末に HA タグを、C 末に V5 タグと FLAG タグを付加したレポーターを用いた。RFS の解析には、停滞配列の直後にグアニン残基を 1 塩基挿入したレポーターを使用した。読み枠が変わらないと *HIS3* の手前の終始コドンで翻訳が終結するが、+1 RFS が生じると *HIS3* の C 末端の終始コドンまで翻訳が行われる。そのため、産生されるタンパク質の分子量から+1 RFS が生じたかが判断できる。また本解析では、右に示す変異株と手法を利用することで、RQC、NGD^{RQC+}、NGD^{RQC-}、RFS の評価を行った。W.B.: Western blotting, N.B.: Northern blotting

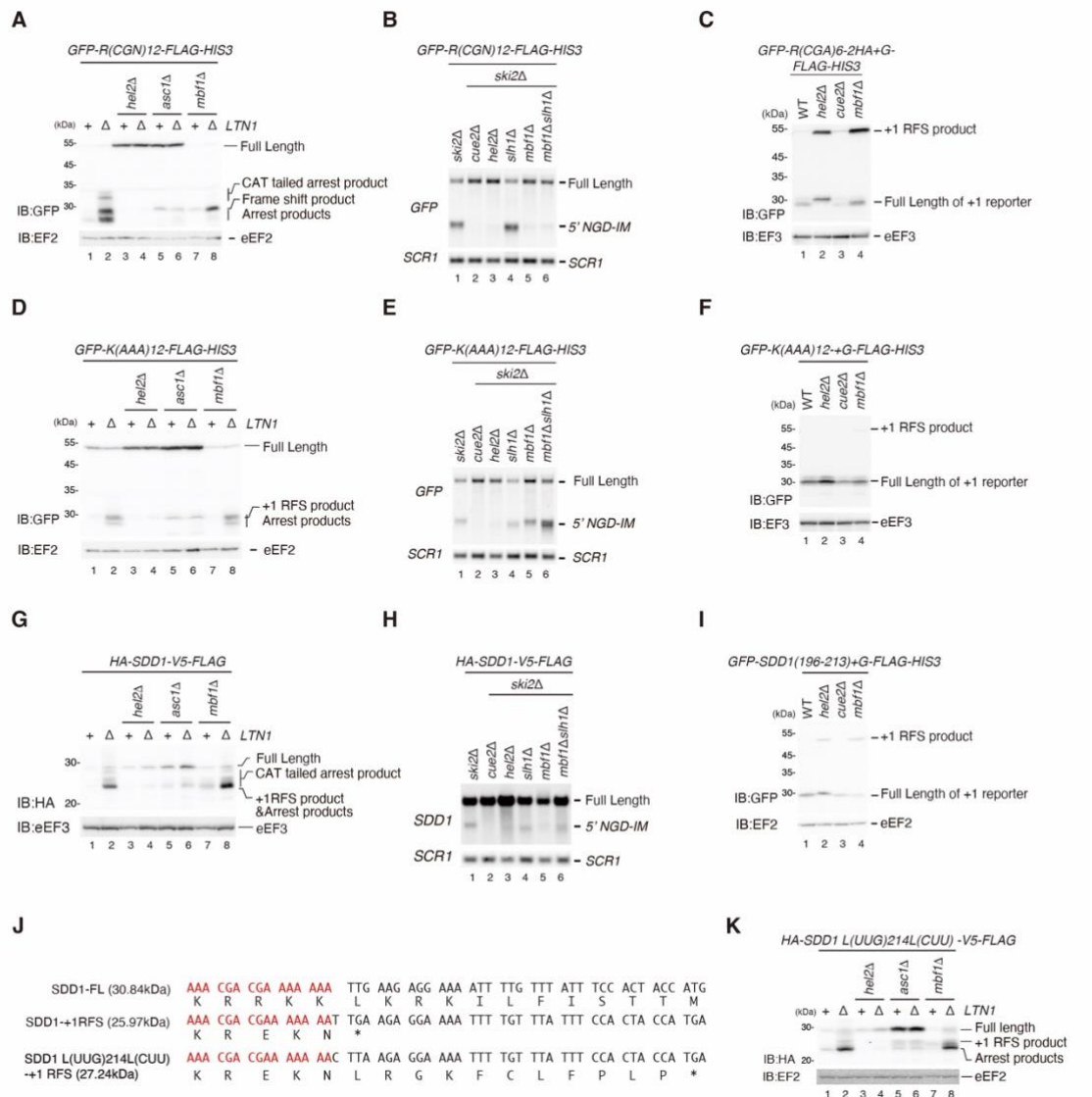


図 1.2 各停滞配列に起因したイベントに対する Mbf1 の機能解析結果

A. Mbf1 はレアコドン連続配列における RQC を促進する。 *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。変異株におけるアレスト産物および+1 RFS 産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。 **B.** Mbf1 はレアコドン連続配列における NGD^{RQC+}と NGD^{RQC-}の誘導に必要である。 *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来する 5' NGD-IM のノーザン・ブロット。変異株における 5' NGD-IM は、GFP プロブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。 **C.** Mbf1 はレアコドン連続配列における+1 RFS を抑制する。 *GFP-*

R(CGA)6-2HA+G-FLAG-HIS3 mRNA に由来する+1 RFS 産物のウエスタン・ブロット。変異株における+1 RFS 産物および全長産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。D. Mbf1 は poly(A)連続配列における RQC に必要でない。*GFP-K(AAA)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウエスタン・ブロット。変異株におけるアレスト産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。E. Mbf1 は poly(A)配列における NGD^{RQC+}と NGD^{RQC-}の誘導に必要でない。*GFP-K(AAA)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来する 5'NGD-IM のノーザン・ブロット。変異株における 5'NGD-IM は、GFP プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。F. Mbf1 は poly(A)配列における+1 RFS に必要でない。*GFP-K(AAA)12+G-FLAG-HIS3* mRNA に由来する+1 RFS 産物のウエスタン・ブロット。変異株における+1 RFS 産物および全長産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF3 はローディング・コントロールとして使用した。G. Mbf1 は *SDD1* 配列における RQC に不要である。*HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来するアレスト産物のウエスタン・ブロット。変異株におけるアレスト産物は、抗 HA 抗体で検出した。eEF3 はローディング・コントロールとして使用した。H. Mbf1 は *SDD1* 配列における NGD^{RQC+}とに必要であるが、NGD^{RQC-}の誘導には不要である。*HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来する 5'NGD-IM のノーザン・ブロット。変異株における 5'NGD-IM は、抗 SDD1 プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。I. Mbf1 は *SDD1* 最小停滞配列における+1 RFS を抑制する。*GFP-SDD1 (196-213 a.a.) +G-FLAG-HIS3* mRNA に由来する+1 RFS 産物のウエスタン・ブロット。変異株における+1 RFS 産物および全長産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。J. 推定上の *SDD1* 翻訳産物の概略図。+1 RFS は、*SDD1* のアレスト配列でフレームシフトがずれた場合の産物 (25.97 kDa) を示す。*SDD1 L(UUG)214L(CUU)*に由来する推定上のフレームシフト産物は 27.24 kDa であり、RQC によって生成されるアレスト産物 (約 24 kDa) とは区別できます。K. Mbf1 は *SDD1* 配列における+1 RFS に必要でない。*HA-SDD1-L(UUG)214L(CUU)-V5-FLAG*

mRNA に由来する+1 RFS 産物および全長産物のウェスタン・ブロット。変異株における+1 RFS 産物および全長産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。

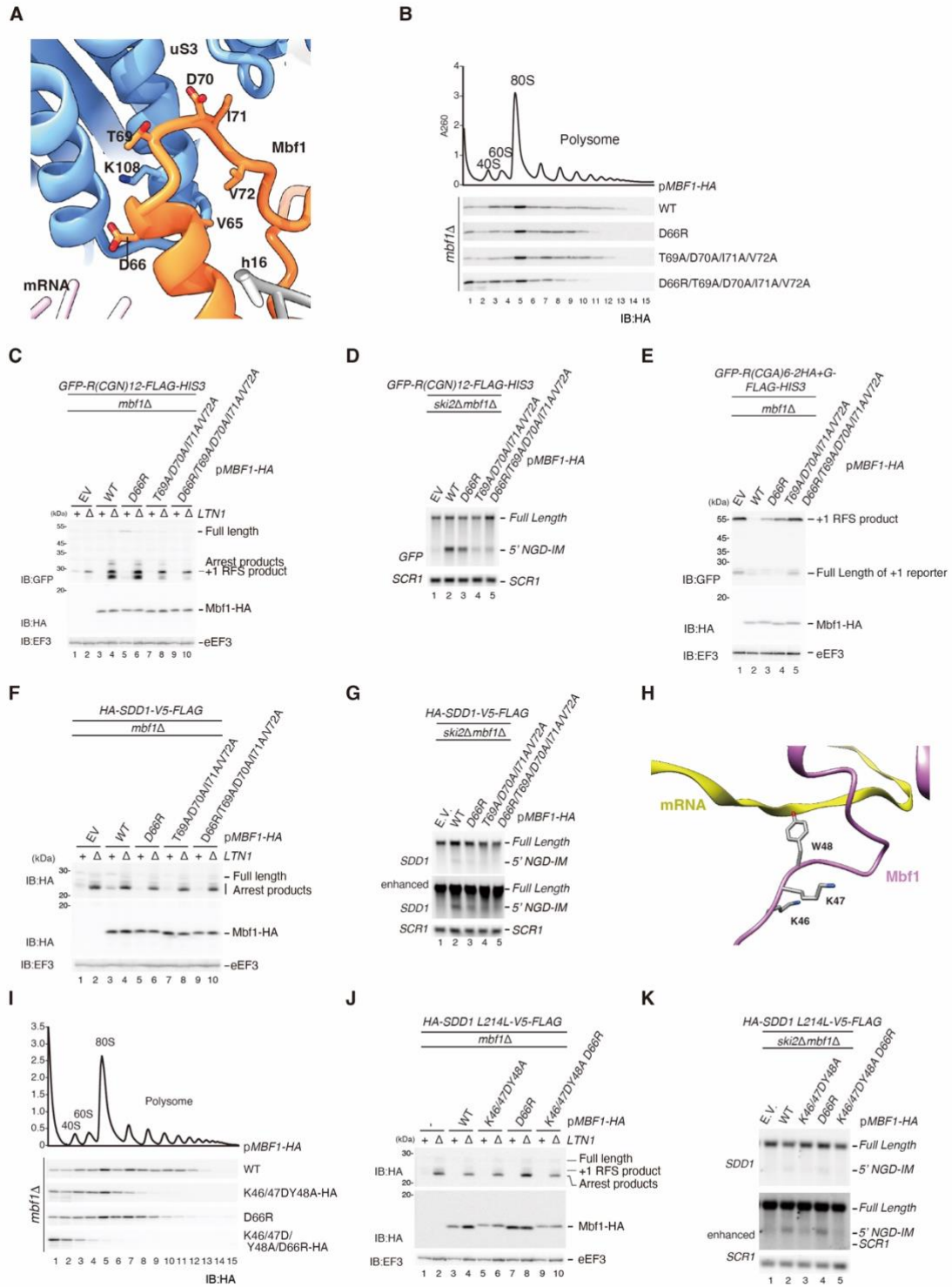


図 1-3. Mbf1 のリボソーム結合能が、リボソーム衝突に起因するイベントの誘導制御に必要である。

A. mRNA entry channel およびヘリックス 16 (h16) 付近の Mbf1-uS3 相互作用部位の分子モデル (PDB: 6ZVI)。相互作用に重要な Mbf1 および uS3 の残基はスティックとして示している (Mbf1 の D66、T69、D70、I71、V72、uS3 の K108)。

B. uS3 と相互作用するアミノ酸残基に変異を導入した Mbf1 は、リボソームへの結合が低下する。それぞれの Mbf1-HA 変異体を発現した細胞ライセートをショ糖密度勾配で超遠心分離し、勾配画分を抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。

C. Mbf1 のリボソーム結合能がレアコドン連続配列における RQC に必要である。*GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株におけるアレスト産物および+1 RFS 産物は、抗 GFP 抗体で検出した。Mbf1-HA 変異体は抗 HA 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。

D. Mbf1 のリボソーム結合能がレアコドン連続配列における NGD に必要である。*GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来する 5' *NGD-IM* のノーザン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株における 5' *NGD-IM* は、GFP プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。

E. Mbf1 のリボソーム結合能が、レアコドン連続配列における RFS の抑制に必要である。*GFP-R(CGA)6-2HA+G-FLAG-HIS3* mRNA に由来する+1 RFS 産物のウェスタン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株における+1 RFS 産物および全長産物は、抗 GFP 抗体で検出した。Mbf1-HA 変異体は抗 HA 抗体で検出した。eEF3 はローディング・コントロールとして使用した。

F. Mbf1 のリボソーム結合能は *SDD1* 配列における RQC に不要である。*HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株におけるアレスト産物および Mbf1-HA は、抗 HA 抗体で検出した。eEF3 はローディング・コントロールとして使用した。

G. Mbf1 のリボソーム結合能が *SDD1* 配列における NGD に部分的に必要である。*HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来する 5' *NGD-IM* のノーザン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株における 5'

NGD-IM は、*SDD1* プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。 **H.** mRNA-Mbf1 相互作用部位の分子モデル (PDB: 6ZVI)。相互作用に重要な Mbf1 および uS3 の残基はスティックとして示している (Mbf1 の K46、K47、W48)。 **I.** mRNA と相互作用するアミノ酸残基に変異を導入した Mbf1 は、リボソームへの結合が低下する。それぞれの Mbf1-HA 変異体を発現した細胞ライセートをショ糖密度勾配で超遠心分離し、勾配画分を抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した。 **J.** Mbf1 のリボソーム結合能は *SDD1* 配列における RQC に不要である。 *HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株におけるアレスト産物および Mbf1-HA 変異体は、抗 HA 抗体で検出した。eEF3 はローディング・コントロールとして使用した。 **K.** Mbf1 のリボソーム結合能が *SDD1* 配列における NGD に必要である。 *HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来する 5' *NGD-IM* のノーザン・ブロット。各 Mbf1 変異体を相補した株における 5' *NGD-IM* は、*SDD1* プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。

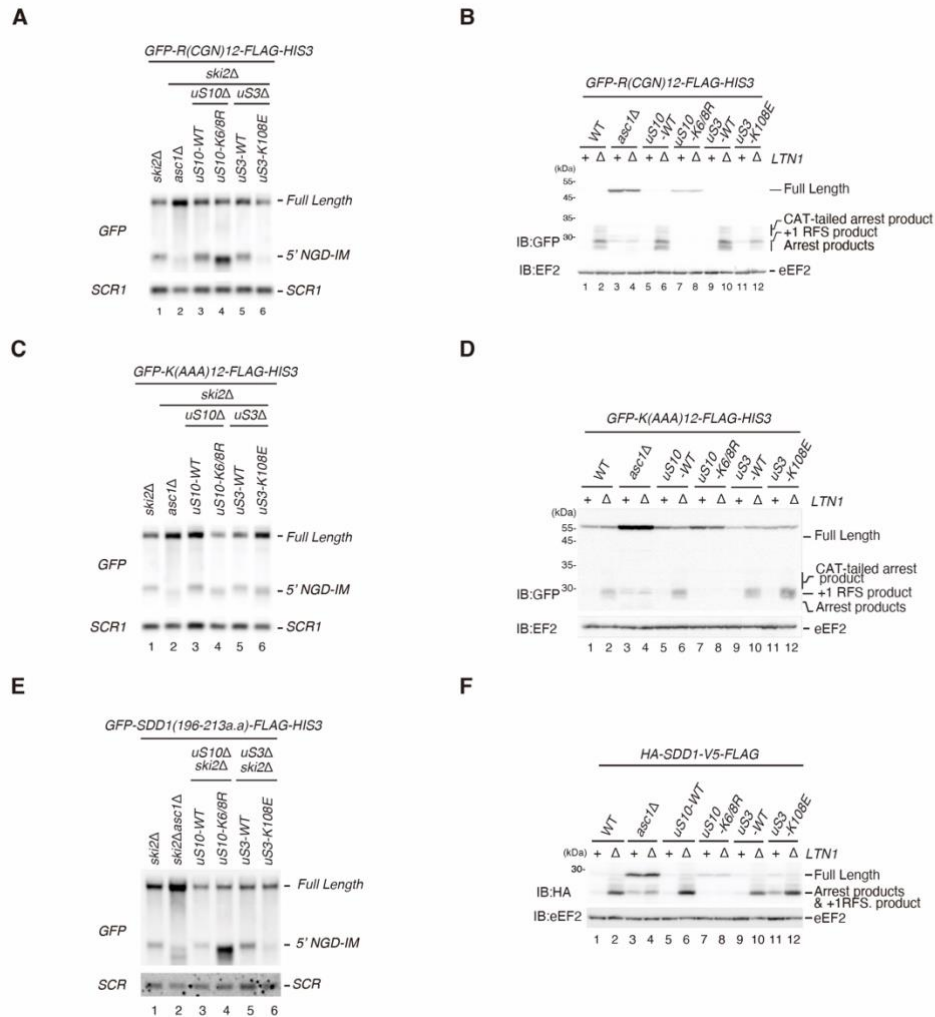


図 1-4. *uS3K108E* 変異株は、*mbf1Δ*株と同様の表現型を示す。

A. *uS3K108E*変異株では、レアコドン連続配列における NGD が生じない。*GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来する 5' NGD-IM のノーザン・ブロット。変異株における 5' NGD-IM は、GFP プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。 **B.** *uS3K108E* 変異株ではレアコドン連続配列における RQC が抑制される。*GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。変異株におけるアレスト産物および+1 RFS 産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。 **C.** *uS3K108E* 変異株では、poly(A)配列における NGD が生じる。*GFP-K(AAA)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来する 5' NGD-IM のノーザン・ブロ

ット。変異株における *5'NGD-IM* は、GFP プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。**D.** *uS3K108E* 変異株では poly(A) 配列で RQC が生じる。*GFP-K(AAA)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。変異株におけるアレスト産物は、抗 GFP 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。**E.** *uS3K108E* 変異株では *SDD1* 最小停滞配列における NGD が抑制される。*GFP-SDD1 (196-213 a.a.)-FLAG-HIS3* mRNA に由来する *5'NGD-IM* のノーザン・ブロット。変異株における *5'NGD-IM* は、GFP プローブで検出した。SCR1 はローディング・コントロールとして使用した。**F.** *uS3K108E* 変異株では *SDD1* 配列で RQC が生じる。*HA-SDD1-V5-FLAG* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。変異株におけるアレスト産物は、抗 HA 抗体で検出した。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。

	レアコドン連続配列	PolyA 配列	<i>SDD1</i> 配列
RQC	促進	-	-
NGD^{RQC+}	促進	-	促進
NGD^{RQC-}	促進	-	-
RFS	抑制	-	-

表 1-1. 各停滞配列における各々のイベントに対する Mbf1 の機能

A

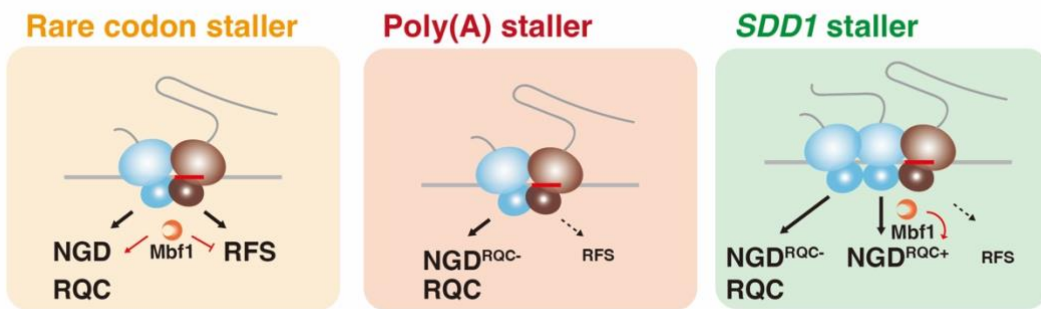


図 1-5. Mbf1 の機能のモデル図

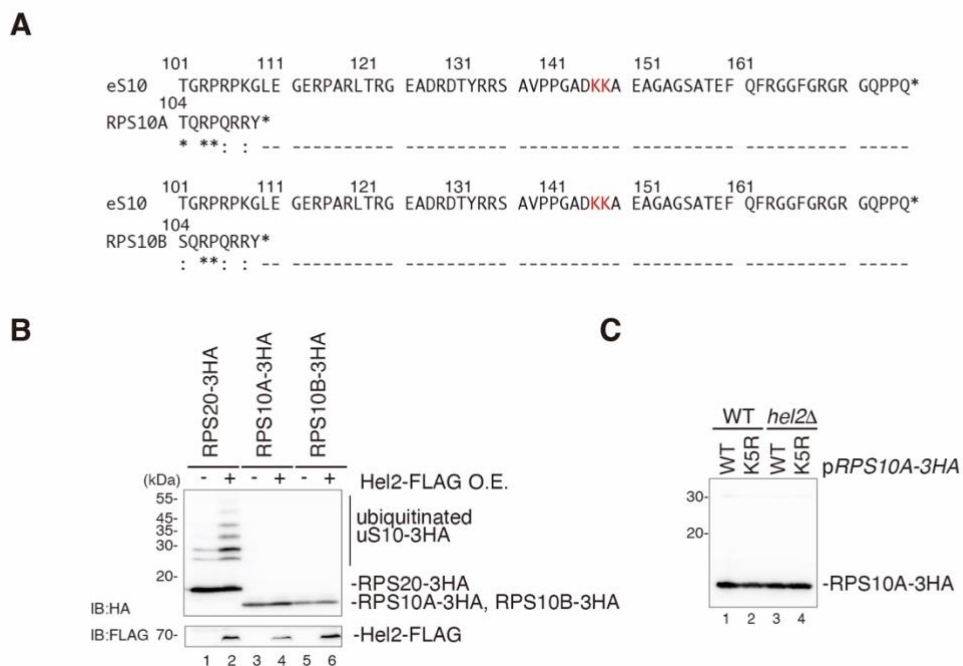


図 2-1. RPS10A および RPS10B は Hel2 によるユビキチン修飾を受けない

A. 哺乳類細胞eS10と出芽酵母eS10 (RPS10AとRPS10B) のアミノ酸配列のアノテーション。
B. Hel2を過剰発現し、HAタグ付きリボソームタンパク質を抗HA抗体を用いたウェスタン・ブロットにより検出した。 **C.** 野生株および*hel2*欠損変異株におけるRps10Aの野生型とK5R変異型を、抗HA抗体を用いたウェスタン・ブロットにより検出した。

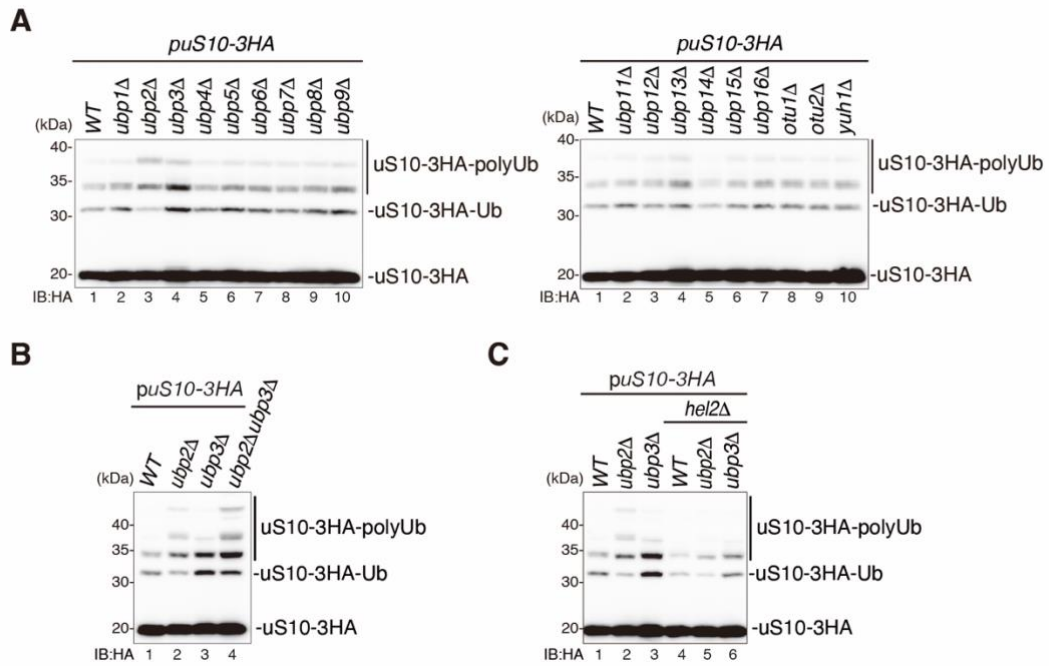


図 2-2. Ubp2 と Ubp3 が uS10 のユビキチン修飾を制御する

A-C. 脱ユビキチン化酵素欠損株における uS10-3HA を、抗 HA 抗体を用いたウェスタン・ブロットにより検出した。

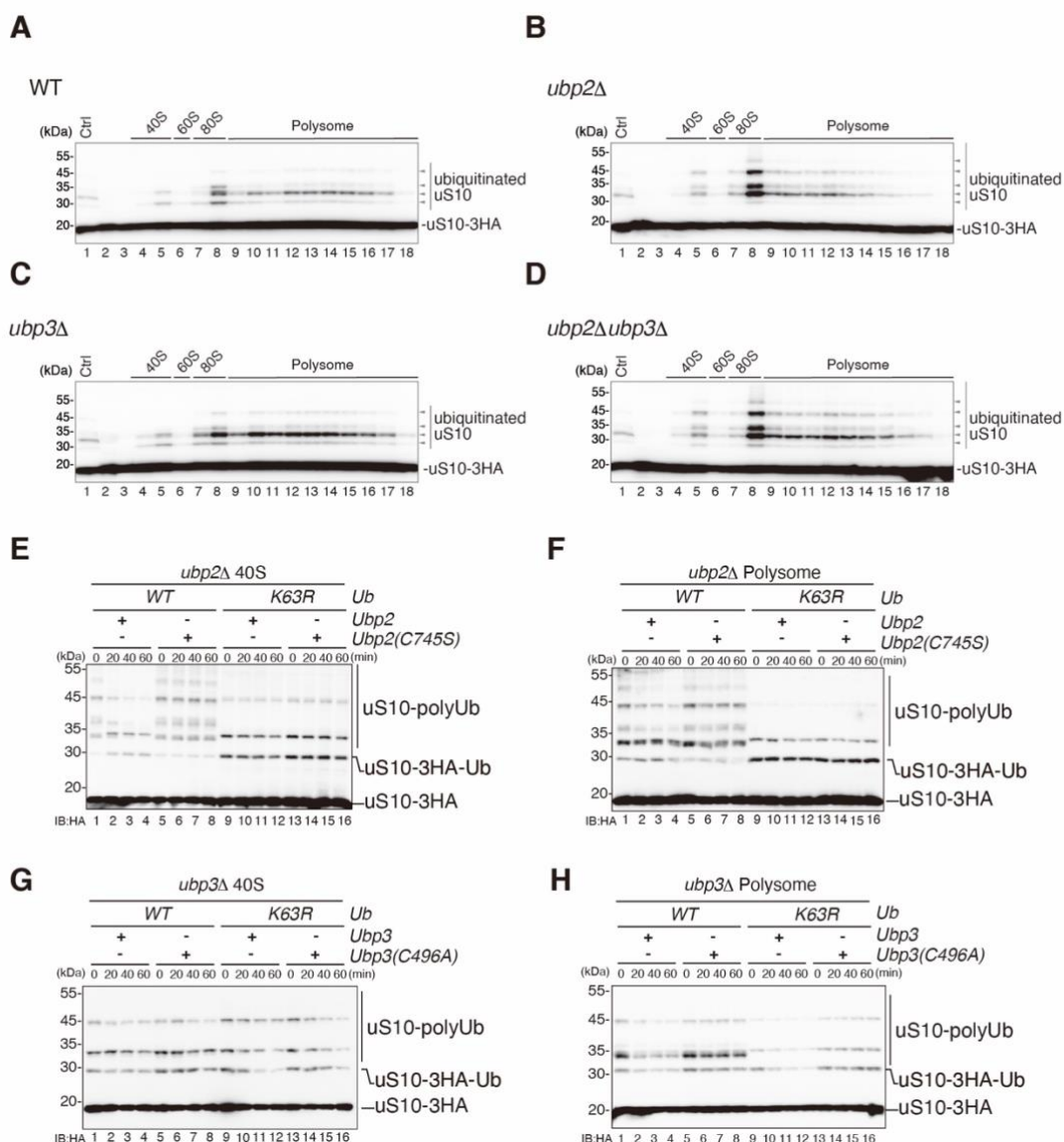


図2-3. Ubp2はサブユニット解離後にユビキチン修飾を消去し、Ubp3は翻訳伸長段階でユビキチン鎖を校正・編集する。

A-D. 細胞溶解液をショ糖密度勾配遠心法によって分離し、各画分のuS10-3HAをHA抗体を用いたウェスタン・ブロットで検出した。**E-H.** 細胞溶解液をショ糖密度勾配遠心法によって分離し、40S画分とポリソーム画分を基質にUbp2とUbp3による脱ユビキチン化反応を行った。uS10-3HAの検出は、HA抗体を用いたウェスタン・ブロットで行った。Ubp2(C745S)およびUbp3(C496A)は、脱ユビキチン化活性を不活化した変異体である。

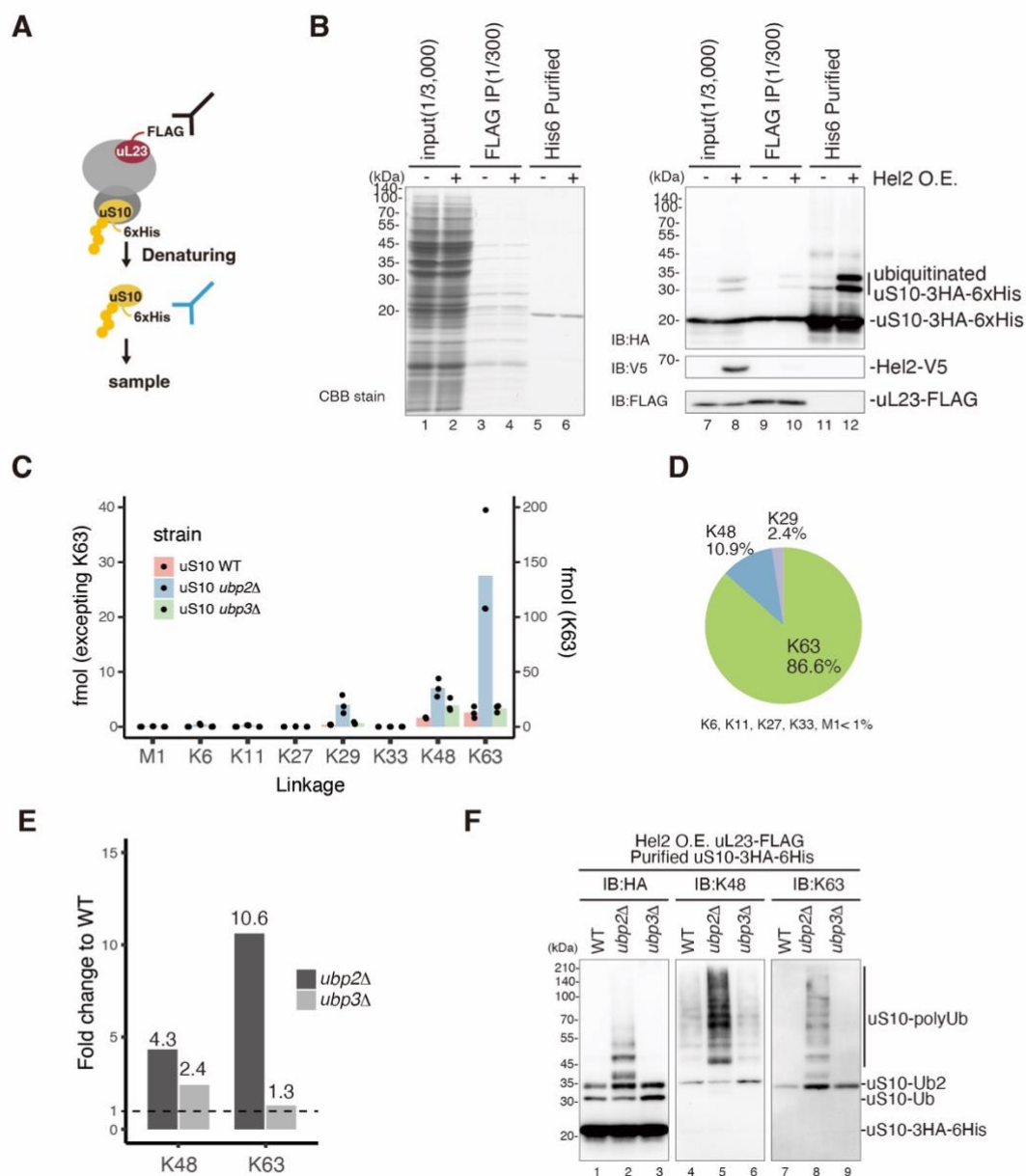


図 2-4. Ubp2 は K48 鎖と K63 鎖の制御を、Ubp3 は K48 鎖の制御を担う

A. uS10 の精製法の概略図。 **B.** 野生株における uS10 の精製。 **C.** Hel2 を過剰発現した野生株および脱ユビキチン化酵素欠損変異株より生成した uS10 に形成されているユビキチン鎖の連結型の定量値。生物学的反復実験 (n=3)。 **D.** C における野生株の連結型の割合。生物学的反復実験 (n=3) の平均値より算出した。 **E.** 野生株と比較した各欠損変異株におけるユビキチン鎖の連結型の倍率変化。生物学的反復実験 (n=3) の平均値より算出した。 **F.**

各株から精製した uS10 を抗 HA 抗体、抗 K48 型特異的ユビキチン抗体、抗 K63 型特異的ユビキチン抗体で検出した。

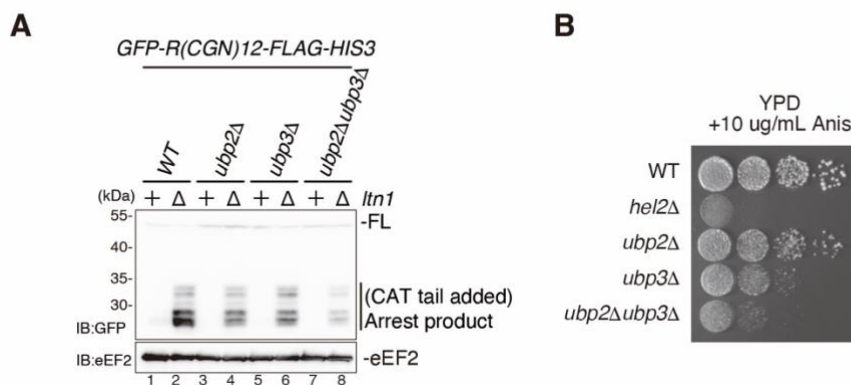


図 2-5. Ubp2 と Ubp3 は RQC を促進する。

A. *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウエスタン・ブロット。

アレスト産物の検出には抗 GFP 抗体を用いた。eEF2 はローディング・コントロールとして使用した。**B.** 欠損変異株におけるアニソマイシン感受性試験。

A

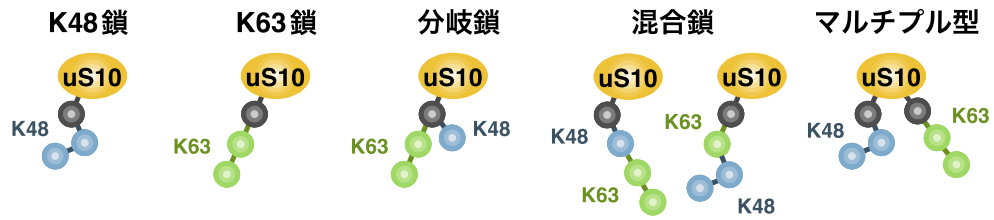
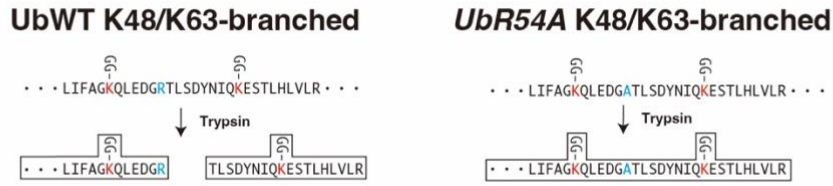


図 2-6. uS10 に形成されうるユビキチン鎖

A. uS10 のユビキチン修飾の概略図。

A



B

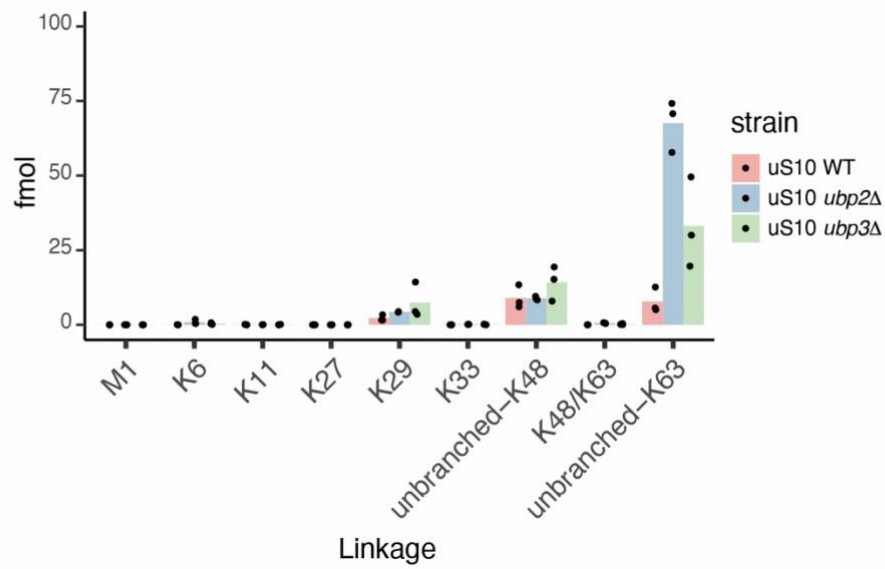


図 2-7. uS10 には K48/K63 型分岐鎖が形成されていない。

A. ユビキチン R54A 変異体を用いた K48/K63 型分岐鎖の計測法の概略図。**B.** 各株における K48/K63 型分岐鎖の測定結果。棒は生物学的反復実験 (n=3) の平均値を示す。点は各サンプルの測定値を示す。

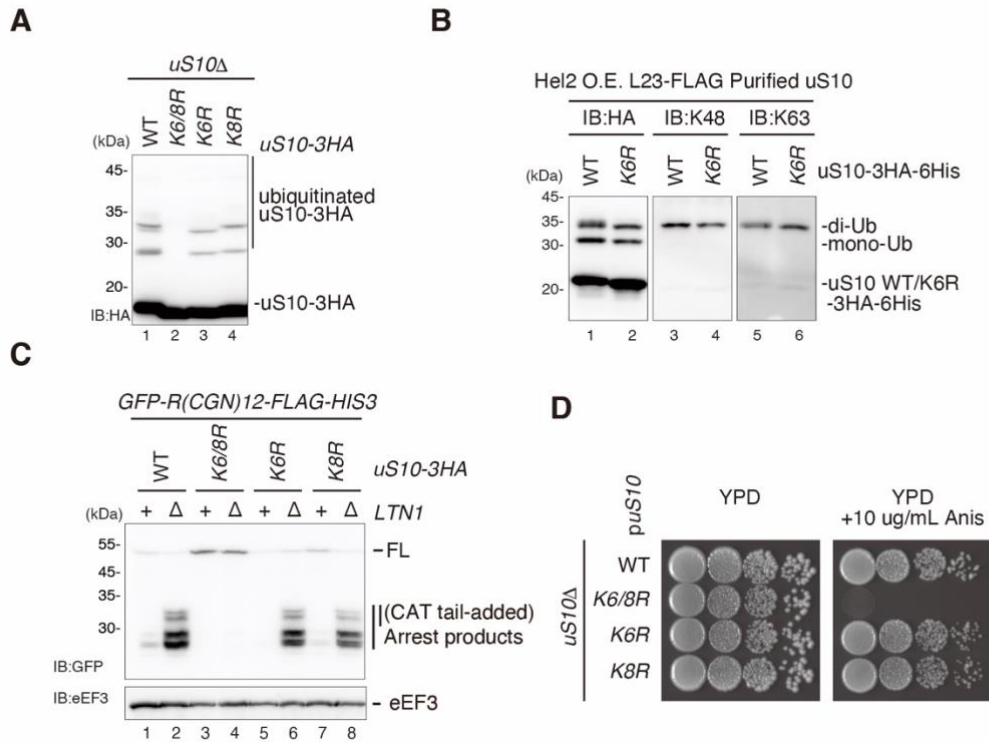


図 2-8. uS10 のマルチプルユビキチン修飾はユビキチン鎖の高次構造および、RQC に影響を与えない。

A. ユビキチン化サイトに変異を導入した uS10-3HA を、抗 HA 抗体を用いたウェスタン・ブロットにより検出した。**B.** 精製した uS10 および uS10K6R 変異体を抗 HA 抗体、抗 K48 型特異的ユビキチン抗体、抗 K63 型特異的ユビキチン抗体で検出した。**C.** *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。アレスト産物の検出には抗 GFP 抗体を用いた。eEF3 はローディング・コントロールとして使用した。**D.** uS10 変異体を相補した株を用いたアニソマイシン感受性試験。

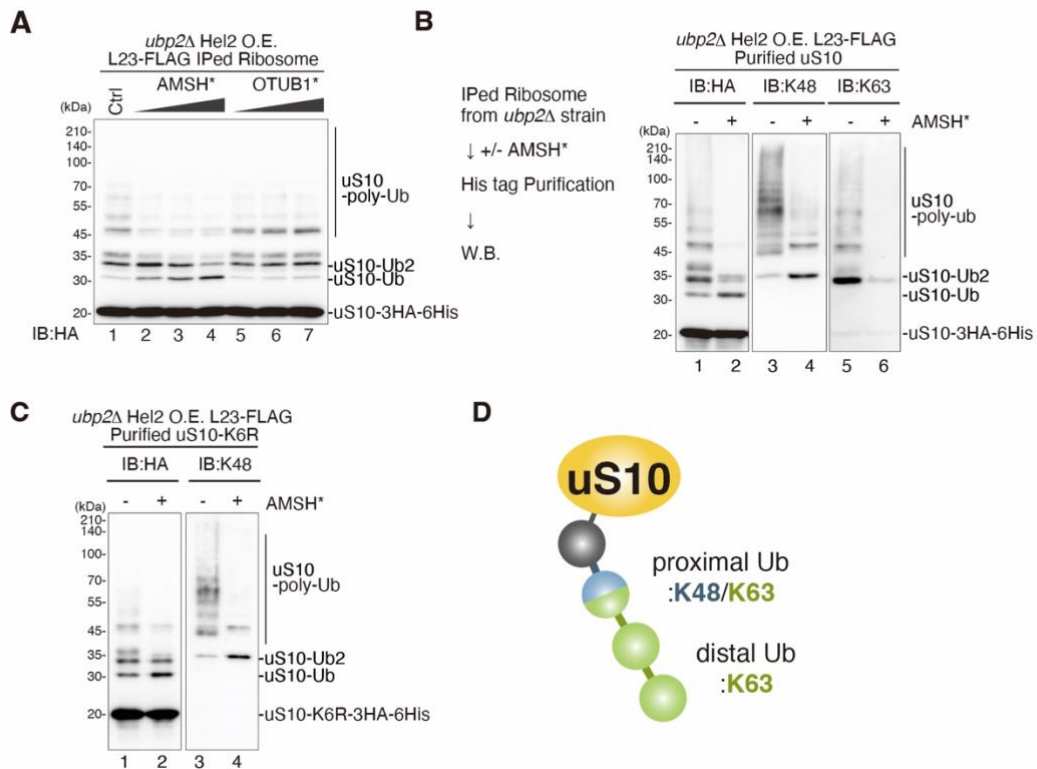


図 2-9. uS10 には根本に K48 鎖、遠位に K63 鎖の混合鎖が形成されている。

A. *ubp2* 欠損株より精製したリボソームを基質とした UbiCRest 解析。抗 HA 抗体を用いたウェスタン・ブロットにより uS10-3HA を検出した。**B.** 実験の概略 (左)。AMSH* で処理後の uS10 を抗 HA 抗体、抗 K48 型特異的ユビキチン抗体、抗 K63 型特異的ユビキチン抗体で検出した (右)。**C.** AMSH* で処理後の uS10 K6R 変異体を抗 HA 抗体、抗 K48 型特異的ユビキチン抗体で検出した。**D.** uS10 に形成されているユビキチン鎖の概略図。

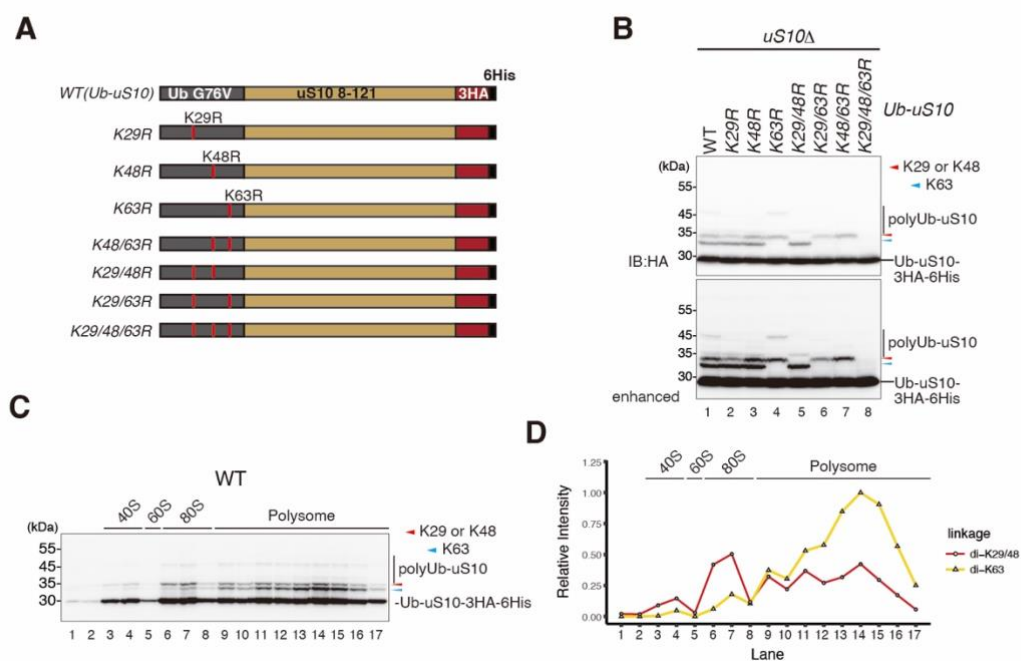


図 2-10. Ubiquitin-fusion uS10 (Ub-uS10)はユビキチン鎖の根本の連結型を解析できる。

A. Ub-uS10 変異体の概略図。 **B.** 3HA タグを付加した Ub-uS10 変異体を抗 HA 抗体を用いたウエスタン・ブロットにより検出した。 **C.** Ub-uS10 をショ糖密度勾配遠心法によって分離し、各画分の Ub-uS10-3HA-6His を HA 抗体を用いたウエスタン・ブロットで検出した。 **D.** C の各 lane におけるバンドのシグナル強度。14lane の di-K63 型ユビキチン鎖のシグナルを 1.0 とし、それぞれのバンド強度の相対値をプロットした。

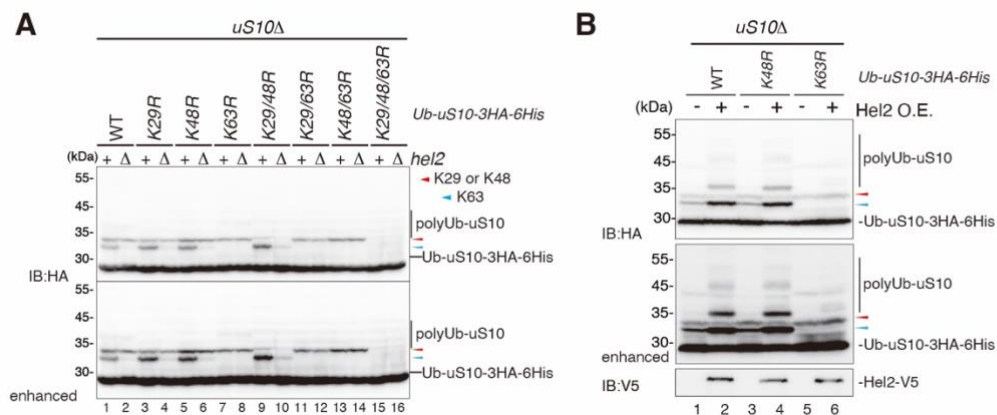


図 2-12. Hel2 は Ub-uS10 に K63 型ユビキチン鎖を形成する。

A. *hel2* 欠損株における Ub-uS10-3HA-6His 変異体を、抗 HA 抗体を用いたウェスタン・ブロットにより検出した。**B.** Hel2 過剰発現株における Ub-uS10-3HA-6His 変異体を、抗 HA 抗体を用いたウェスタン・ブロットにより検出した。

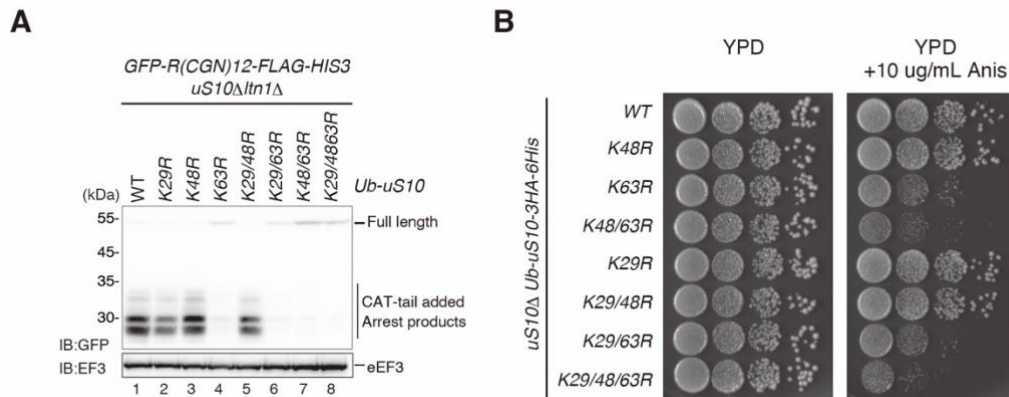


図 2-13. uS10 の根本の K63 型ユビキチン鎖が RQC の誘導に必須である。

A. *GFP-R(CGN)12-FLAG-HIS3* mRNA に由来するアレスト産物のウェスタン・ブロット。

アレスト産物の検出には抗 GFP 抗体を用いた。eEF3 はローディング・コントロールとし

て使用した。**B.** Ub-uS10 を相補した株を用いたアニソマイシン感受性試験。

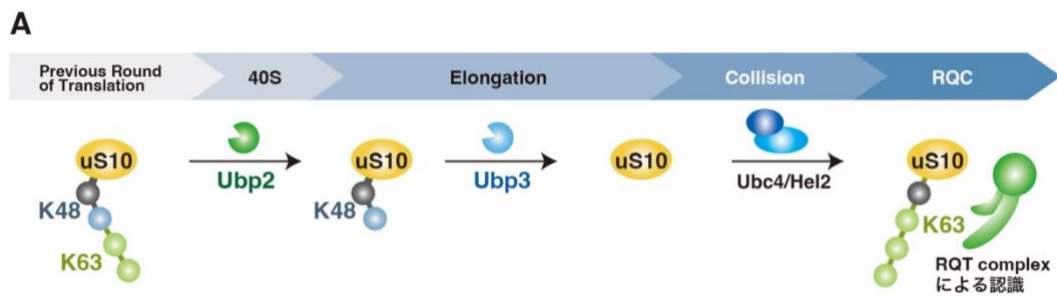


図 2-14. DUB によるユビキチン鎖の高次構造の制御システムのモデル

参考文献

1. Stein, K.C., and Frydman, J. (2019). The stop-and-go traffic regulating protein biogenesis: How translation kinetics controls proteostasis. Preprint at American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 10.1074/jbc.REV118.002814 10.1074/jbc.REV118.002814.
2. Kramer, G., Shiber, A., and Bukau, B. (2018). Annual Review of Biochemistry Mechanisms of Cotranslational Maturation of Newly Synthesized Proteins. 10.1146/annurev-biochem-013118.
3. Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., and Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. Preprint, 10.1038/nsmb.1614 10.1038/nsmb.1614.
4. Pechmann, S., Chartron, J.W., and Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 21, 1100–1105. 10.1038/nsmb.2919.
5. Chartron, J.W., Hunt, K.C.L., and Frydman, J. (2016). Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. *Nature* 536, 224–228. 10.1038/nature19309.
6. Schibich, D., Gloge, F., Pöhner, I., Björkholm, P., Wade, R.C., Von Heijne, G., Bukau, B., and Kramer, G. (2016). Global profiling of SRP interaction with nascent polypeptides. *Nature* 536, 219–223. 10.1038/nature19070.
7. Panasencko, O.O., Somasekharan, S.P., Villanyi, Z., Zagatti, M., Bezrukov, F., Rashpa, R., Cornut, J., Iqbal, J., Longis, M., Carl, S.H., et al. (2019). Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblysomes. *Nat Struct Mol Biol* 26, 110–120. 10.1038/s41594-018-0179-5.
8. Shiber, A., Döring, K., Friedrich, U., Klann, K., Merker, D., Zedan, M., Tippmann, F., Kramer, G., and Bukau, B. (2018). Cotranslational assembly of protein complexes in

- eukaryotes revealed by ribosome profiling. *Nature* *561*, 268–272. 10.1038/s41586-018-0462-y.
9. Bertolini, M., Fenzl, K., Kats, I., Wruck, F., Tippmann, F., Schmitt, J., Auburger, J.J., Tans, S., Bukau, B., and Kramer, G. (2021). Interactions between nascent proteins translated by adjacent ribosomes drive homomer assembly. *Science* (1979) *371*. 10.1126/science.abc7151.
 10. Yip, M.C.J., and Shao, S. (2021). Detecting and Rescuing Stalled Ribosomes. Preprint at Elsevier Ltd, 10.1016/j.tibs.2021.03.008 10.1016/j.tibs.2021.03.008.
 11. D’Orazio, K.N., and Green, R. (2021). Ribosome states signal RNA quality control. Preprint at Cell Press, 10.1016/j.molcel.2021.02.022 10.1016/j.molcel.2021.02.022.
 12. Kim, K.Q., and Zaher, H.S. (2022). Canary in a coal mine: collided ribosomes as sensors of cellular conditions. Preprint at Elsevier Ltd, 10.1016/j.tibs.2021.09.001 10.1016/j.tibs.2021.09.001.
 13. Juszkievicz, S., Chandrasekaran, V., Lin, Z., Kraatz, S., Ramakrishnan, V., and Hegde, R.S. (2018). ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. *Mol Cell* *72*, 469–481.e7. 10.1016/j.molcel.2018.08.037.
 14. Matsuo, Y., Tesina, P., Nakajima, S., Mizuno, M., Endo, A., Buschauer, R., Cheng, J., Shounai, O., Ikeuchi, K., Saeki, Y., et al. (2020). RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1. *Nat Struct Mol Biol* *27*, 323–332. 10.1038/s41594-020-0393-9.
 15. Ikeuchi, K., Tesina, P., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Cheng, J., Saeki, Y., Tanaka, K., Becker, T., Beckmann, R., and Inada, T. (2019). Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2 - driven quality control pathways. *EMBO J* *38*. 10.15252/embj.2018100276.
 16. Narita, M., Denk, T., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Kikuguchi, C., Ito, S., Sato, N., Suzuki,

- T., Hashimoto, S., Machová, I., et al. (2022). A distinct mammalian disome collision interface harbors K63-linked polyubiquitination of uS10 to trigger hRQT-mediated subunit dissociation. *Nat Commun* *13*. 10.1038/s41467-022-34097-9.
17. Han, P., Shichino, Y., Schneider-Poetsch, T., Mito, M., Hashimoto, S., Udagawa, T., Kohno, K., Yoshida, M., Mishima, Y., Inada, T., et al. (2020). Genome-wide Survey of Ribosome Collision. *Cell Rep* *31*. 10.1016/j.celrep.2020.107610.
 18. Wu, C.C.C., Zinshteyn, B., Wehner, K.A., and Green, R. (2019). High-Resolution Ribosome Profiling Defines Discrete Ribosome Elongation States and Translational Regulation during Cellular Stress. *Mol Cell* *73*, 959-970.e5. 10.1016/j.molcel.2018.12.009.
 19. Yan, L.L., Simms, C.L., McLoughlin, F., Vierstra, R.D., and Zaher, H.S. (2019). Oxidation and alkylation stresses activate ribosome-quality control. *Nat Commun* *10*. 10.1038/s41467-019-13579-3.
 20. Arthur, L.L., and Djuranovic, S. (2018). PolyA tracks, polybasic peptides, poly-translational hurdles. Preprint at Blackwell Publishing Ltd, 10.1002/wrna.1486 10.1002/wrna.1486.
 21. Inada, T., and Aiba, H. (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3' -UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO Journal* *24*, 1584–1595. 10.1038/sj.emboj.7600636.
 22. Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2007). Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev* *21*, 519–524. 10.1101/gad.1490207.
 23. Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the

- proteasome. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 10343–10352. 10.1074/jbc.M808840200.
24. Chandrasekaran, V., Juszkievicz, S., Choi, J., Puglisi, J.D., Brown, A., Shao, S., Ramakrishnan, V., and Hegde, R.S. (2019). Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail. *Nat Struct Mol Biol* *26*, 1132–1140. 10.1038/s41594-019-0331-x.
 25. Tesina, P., Lessen, L.N., Buschauer, R., Cheng, J., Wu, C.C., Berninghausen, O., Buskirk, A.R., Becker, T., Beckmann, R., and Green, R. (2020). Molecular mechanism of translational stalling by inhibitory codon combinations and poly(A) tracts. *EMBO J* *39*. 10.15252/embj.2019103365.
 26. Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., and Milos, P.M. (2010). Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* *143*, 1018–1029. 10.1016/j.cell.2010.11.020.
 27. Lu, J., and Deutsch, C. (2008). Electrostatics in the Ribosomal Tunnel Modulate Chain Elongation Rates. *J Mol Biol* *384*, 73–86. 10.1016/j.jmb.2008.08.089.
 28. Juszkievicz, S., and Hegde, R.S. (2017). Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Mol Cell* *65*, 743–750.e4. 10.1016/j.molcel.2016.11.039.
 29. Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., et al. (2017). Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat Commun* *8*. 10.1038/s41467-017-00188-1.
 30. Gamble, C.E., Brule, C.E., Dean, K.M., Fields, S., and Grayhack, E.J. (2016). Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast. *Cell* *166*, 679–690.

- 10.1016/j.cell.2016.05.070.
31. Letzring, D.P., Wolf, A.S., Brule, C.E., and Grayhack, E.J. (2013). Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA* *19*, 1208–1217. 10.1261/rna.039446.113.
 32. Wolf, A.S., and Grayhack, E.J. (2015). Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA* *21*, 935–945. 10.1261/rna.049080.114.
 33. Mizuno, M., Ebine, S., Shounai, O., Nakajima, S., Tomomatsu, S., Ikeuchi, K., Matsuo, Y., and Inada, T. (2021). The nascent polypeptide in the 60S subunit determines the Rqc2-dependency of ribosomal quality control. *Nucleic Acids Res* *49*, 2102–2113. 10.1093/nar/gkab005.
 34. Matsuo, Y., and Inada, T. (2021). The ribosome collision sensor Hel2 functions as preventive quality control in the secretory pathway. *Cell Rep* *34*. 10.1016/j.celrep.2021.108877.
 35. Juszkievicz, S., Slodkiewicz, G., Lin, Z., Freire-Pritchett, P., Peak-Chew, S.Y., and Hegde, R.S. (2020). Ribosome collisions trigger cis-acting feedback inhibition of translation initiation. *Elife* *9*, 1–29. 10.7554/eLife.60038.
 36. Sinha, N.K., Ordureau, A., Best, K.M., Saba, J.A., Zinshteyn, B., Sundaramoorthy, E., Fulzele, A., Garshott, D.M., Denk, T., Thoms, M., et al. (2020). EDF1 coordinates cellular responses to ribosome collisions. *Elife* *9*, 1–84. 10.7554/ELIFE.58828.
 37. Matsuo, Y., Uchihashi, T., and Inada, T. (2023). Decoding of the ubiquitin code for clearance of colliding ribosomes by the RQT complex. *Nat Commun* *14*. 10.1038/s41467-022-35608-4.
 38. Sundaramoorthy, E., Leonard, M., Mak, R., Liao, J., Fulzele, A., and Bennett, E.J. (2017). ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality

- Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Mol Cell* *65*, 751-760.e4. 10.1016/j.molcel.2016.12.026.
39. Yalçın, Z., Koot, D., Bezstarosti, K., Salas-Lloret, D., Bleijerveld, O.B., Boersma, V., Falcone, M., González-Prieto, R., Altelaar, M., Demmers, J.A.A., et al. (2023). Ubiquitinome Profiling Reveals in Vivo UBE2D3 Targets and Implicates UBE2D3 in Protein Quality Control. *Molecular and Cellular Proteomics* *22*. 10.1016/j.mcpro.2023.100548.
 40. Garzia, A., Jafarnejad, S.M., Meyer, C., Chapat, C., Gogakos, T., Morozov, P., Amiri, M., Shapiro, M., Molina, H., Tuschl, T., et al. (2017). The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs. *Nat Commun* *8*. 10.1038/ncomms16056.
 41. Sitron, C.S., Park, J.H., and Brandman, O. (2017). Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation. 10.1261/rna.
 42. Best, K., Ikeuchi, K., Kater, L., Best, D., Musial, J., Matsuo, Y., Berninghausen, O., Becker, T., Inada, T., and Beckmann, R. (2023). Structural basis for clearing of ribosome collisions by the RQT complex. *Nat Commun* *14*. 10.1038/s41467-023-36230-8.
 43. Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., et al. (2012). A Ribosome-Bound Quality Control Complex Triggers Degradation of Nascent Peptides and Signals Translation Stress. *Cell* *151*, 1042–1054. 10.1016/j.cell.2012.10.044.
 44. Lyumkis, D., Dos Passosb, D.O., Tahara, E.B., Webb, K., Bennett, E.J., Vinterbo, S., Potter, C.S., Carragher, B., and Joazeiro, C.A.P. (2014). Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 15981–15986.

- 10.1073/pnas.1413882111.
45. Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S., and Inada, T. (2014). Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes to Cells* *19*, 1–12. 10.1111/gtc.12106.
 46. Bengtson, M.H., and Joazeiro, C.A.P. (2010). Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* *467*, 470–473. 10.1038/nature09371.
 47. Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., et al. (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 5046–5051. 10.1073/pnas.1221724110.
 48. Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., et al. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains.
 49. Tesina, P., Ebine, S., Buschauer, R., Thoms, M., Matsuo, Y., Inada, T., and Beckmann, R. (2023). Molecular basis of eIF5A-dependent CAT tailing in eukaryotic ribosome-associated quality control. *Mol Cell* *83*, 607–621.e4. 10.1016/j.molcel.2023.01.020.
 50. Su, T., Izawa, T., Thoms, M., Yamashita, Y., Cheng, J., Berninghausen, O., Hartl, F.U., Inada, T., Neupert, W., and Beckmann, R. (2019). Structure and function of Vms1 and Arbl in RQC and mitochondrial proteome homeostasis. *Nature* *570*, 538–542. 10.1038/s41586-019-1307-z.
 51. Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J., and Deshaies, R.J. (2013). Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife* *2013*. 10.7554/eLife.00308.
 52. Tomomatsu, S., Watanabe, A., Tesina, P., Hashimoto, S., Ikeuchi, K., Li, S., Matsuo, Y., Beckmann, R., and Inada, T. (2023). Two modes of Cue2-mediated mRNA

- cleavage with distinct substrate recognition initiate no-go decay. *Nucleic Acids Res* *51*, 253–270. 10.1093/nar/gkac1172.
53. D’Orazio, K.N., Wu, C.C.C., Sinha, N., Loll-Krippleber, R., Brown, G.W., and Green, R. (2019). The endonuclease *cue2* cleaves mRNAs at stalled ribosomes during no go decay. *Elife* *8*. 10.7554/eLife.49117.001.
 54. Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* *440*, 561–564. 10.1038/nature04530.
 55. Wang, J., Zhou, J., Yang, Q., and Grayhack, E.J. (2018). Multi-protein bridging factor 1(Mbf1), Rps3 and Asc1 prevent stalled ribosomes from frameshifting. 10.7554/eLife.39637.001.
 56. Houston, L., Platten, E.M., Connelly, S.M., Wang, J., and Grayhack, E.J. (2022). Frameshifting at collided ribosomes is modulated by elongation factor eEF3 and by integrated stress response regulators Gcn1 and Gcn20. 10.1261/rna.
 57. Simms, C.L., Yan, L.L., Qiu, J.K., and Zaher, H.S. (2019). Ribosome Collisions Result in +1 Frameshifting in the Absence of No-Go Decay. *Cell Rep* *28*, 1679-1689.e4. 10.1016/j.celrep.2019.07.046.
 58. Saito, K., Kratzat, H., Campbell, A., Buschauer, R., Burroughs, A.M., Berninghausen, O., Aravind, L., Green, R., Beckmann, R., and Buskirk, A.R. (2022). Ribosome collisions induce mRNA cleavage and ribosome rescue in bacteria. *Nature* *603*, 503–508. 10.1038/s41586-022-04416-7.
 59. Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. Preprint at Nature Publishing Group, 10.1038/cr.2016.39 10.1038/cr.2016.39.
 60. Pohl, C., and Dikic, I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy.
 61. Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* *81*, 203–

229. 10.1146/annurev-biochem-060310-170328.
62. Sato, Y. (2022). Structural basis for the linkage specificity of ubiquitin-binding domain and deubiquitinase. Preprint at Oxford University Press, 10.1093/jb/mvac031 10.1093/jb/mvac031.
 63. Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., and Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Mol Cell* *64*, 251–266. 10.1016/j.molcel.2016.09.014.
 64. Yau, R.G., Doerner, K., Castellanos, E.R., Haakonsen, D.L., Werner, A., Wang, N., Yang, X.W., Martinez-Martin, N., Matsumoto, M.L., Dixit, V.M., et al. (2017). Assembly and Function of Heterotypic Ubiquitin Chains in Cell-Cycle and Protein Quality Control. *Cell* *171*, 918-933.e20. 10.1016/j.cell.2017.09.040.
 65. Akizuki, Y., Morita, M., Mori, Y., Kaiho-Soma, A., Dixit, S., Endo, A., Shimogawa, M., Hayashi, G., Naito, M., Okamoto, A., et al. (2023). cIAP1-based degraders induce degradation via branched ubiquitin architectures. *Nat Chem Biol* *19*, 311–322. 10.1038/s41589-022-01178-1.
 66. Kaiho-Soma, A., Akizuki, Y., Igarashi, K., Endo, A., Shoda, T., Kawase, Y., Demizu, Y., Naito, M., Saeki, Y., Tanaka, K., et al. (2021). TRIP12 promotes small-molecule-induced degradation through K29/K48-branched ubiquitin chains. *Mol Cell* *81*, 1411-1424.e7. 10.1016/j.molcel.2021.01.023.
 67. Juszkievicz, S., Speldewinde, S.H., Wan, L., Svejstrup, J.Q., and Hegde, R.S. (2020). The ASC-1 Complex Disassembles Collided Ribosomes. *Mol Cell* *79*, 603-614.e8. 10.1016/j.molcel.2020.06.006.
 68. Weinert, B.T., Schölz, C., Wagner, S.A., Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J.A., and Choudhary, C. (2013). Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep* *4*, 842–

851. 10.1016/j.celrep.2013.07.024.
69. Tsuchiya, H., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2013). The parallel reaction monitoring method contributes to a highly sensitive polyubiquitin chain quantification. *Biochem Biophys Res Commun* *436*, 223–229. 10.1016/j.bbrc.2013.05.080.
 70. Hospenthal, M.K., Mevissen, T.E.T., and Komander, D. (2015). Deubiquitinase-based analysis of ubiquitin chain architecture using Ubiquitin Chain Restriction (UbiCRest). *Nat Protoc* *10*, 349–361. 10.1038/nprot.2015.018.
 71. Johnson, E.S., Ma, P.C.M., Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1995). THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY A Proteolytic Pathway That Recognizes Ubiquitin as a Degradation Signal*.
 72. Ikeuchi, K., Ivic, N., Buschauer, R., Cheng, J., Fröhlich, T., Matsuo, Y., Berninghausen, O., Inada, T., Becker, T., and Beckmann, R. (2023). Molecular basis for recognition and deubiquitination of 40S ribosomes by Otu2. *Nat Commun* *14*. 10.1038/s41467-023-38161-w.
 73. Garshott, D.M., Sundaramoorthy, E., Leonard, M., and Bennett, E.J. (2020). Distinct regulatory ribosomal ubiquitylation events are reversible and hierarchically organized. *Elife* *9*. 10.7554/eLife.54023.

謝辞

本博士論文の審査にあたり、主査を務めていただきました村田茂穂教授に深く感謝申し上げます。また副査を務めてくださいました一條秀憲教授、北川大樹教授、名黒功准教授、福山征光講師にもお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、丁寧なご指導を承りました稲田利文教授に深く感謝申し上げます。日々の研究生活において様々な助言をいただくとともに研究に対する心構えについて教えていただきました。大変お忙しい中、ご指導くださりありがとうございました。

松尾芳隆准教授には実験においてご指導を承りました。ありがとうございました。

東京大学の佐伯泰教授、星薬科大学の大竹史明特任准教授には質量分析による解析において大変お世話になりました。

I would like to thank Prof. Roland Beckmann and Dr. Petr Tesina, LUM Munich for mutant analysis of Mbf1.

鈴木亨助教、李思涵助教、橋本怜史特任研究員、星美穂技術専門職員、菊口千智学術専門職員、稲田敦子秘書には快適な研究環境を提供していただきました。おかげさまで充実して実験を行うことができました。感謝申し上げます。稲田研究室の学生の皆さんとは、楽しい研究室生活を過ごさせていただきました。また、いつも支えてくださった家族と友人の皆様にも感謝申し上げます。

皆様への心からのお礼を申し上げたく、謝辞に返させていただきます。